



RENORBIO
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

Bioprospecção e Obtenção de um Bioproduto Utilizando Micro-Organismos da Turfa para a Biodegradação de Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA)

Anuska Conde Fagundes Soares Garcia

São Cristóvão – Sergipe
Abril/201



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



Anuska Conde Fagundes Soares Garcia

**Bioprospecção e Obtenção de um Bioproduto Utilizando Micro-organismos da
Turfa para a Biodegradação de Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA)**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Sergipe (RENORBIO/UFS), para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

Orientador: Profa. Dra. Luciane Pimenta Cruz Romão

**São Cristóvão – Sergipe
Abril/2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

G216b Garcia, Anuska Conde Fagundes Soares
Bioprospecção e obtenção de um bioproduto utilizando micro-organismos da turfa para a biodegradação de Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA) / Anuska Conde Fagundes Soares Garcia ; orientadora Luciane Pimenta Cruz Romão. – São Cristóvão, 2016.
156 f. : il.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Biotecnologia. 2. Fluoranteno. 3. Turfa. 4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – Aspectos ambientais. 5. Células – Mecanismos de controle. 6. Quitosana. I. Romão, Luciane Pimenta Cruz, orient. II. Título.

CDU 606:547.686

ANUSKA CONDE FAGUNDES SOARES GARCIA

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Sergipe (RENORBIO/UFS), como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 07 de Abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Orientadora: Profa. Dra. Luciane Pimenta Cruz Romão
Universidade Federal de Sergipe (RENORBIO/SE)



Prof. Dr. Leandro Eugênio Cardamone Diniz
EMBRAPA Tabuleiros Costeiros



Prof. Dr. Sandro Navickiene
Universidade Federal de Sergipe (Programa de Pós-Graduação em Química)



Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza
Universidade Federal de Sergipe (RENORBIO/SE)



Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam
Universidade Federal de Sergipe (RENORBIO/SE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado todas as virtudes para eu ter chegado até aqui;

A Universidade Federal de Sergipe (UFS), por toda a infra-estrutura e por ter sido a sede da realização dessa conquista;

Ao RENORBIO e a todos os professores e funcionários que o compõem, obrigada pela troca de conhecimento e pela vontade de construirmos juntos, um mundo melhor;

A Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC), pela bolsa de doutorado concedida;

A professora Dra. Luciane Romão, minha orientadora, por ter me aceitado para ser sua orientanda sem nem mesmo me conhecer pessoalmente e por ter tornado esse meu objetivo em realidade. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade!;

A todos os colegas do Laboratório de Estudo da Matéria Orgânica Natural (LEMON) pelo acolhimento, pelas ajudas constantes e por tornarem os meus dias mais alegres. Em especial, gostaria de agradecer a Bruno, não só pelo seu jeito alegre e extrovertido que faz com que o laboratório fosse sempre descontraído, como também pela ajuda direta neste trabalho na parte química, e também a Arnaldo, pela amizade e por ter permitido dar a minha contribuição no seu trabalho de mestrado e ter sido sua co-autora em 2 artigos já publicados;

Aos professores, colegas e técnicos do Departamento de Química, onde passei a maior parte do doutorado, obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar;

Ao professor Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior, que abriu gentilmente as portas do Laboratório de Microbiologia Aplicada para que pudesse ser realizada a parte de isolamento dos micro-organismos da Turfa e por ter me orientado nesta parte do trabalho;

Ao pesquisador Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz da Embrapa Tabuleiros Costeiros, por ter contribuído de forma primordial com este trabalho permitindo a utilização de toda a infra-estrutura do Laboratório de Biologia Molecular para que fosse realizada a parte da extração de DNA e PCR dos micro-organismos isolados e por todos os ensinamentos repassados sempre de forma solícita e agradável, o meu muito obrigada!;

Ao professor Dr. André Luiz Meleiro Porto por ter me dado a oportunidade de passar 1 mês em seu Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise (USP-São Carlos) e ter aprendido muito com a sua equipe. Foi muito proveitoso! Gostaria de agradecer também aos seus alunos, em especial Willian Birolli por ter me ajudado diretamente no trabalho e também a técnica Marília Peret, por sempre estar disposta a ajudar;

A Dra. Carla Guinart Marques, do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da UFSCAR, que realizou todo o tratamento dos eletroferogramas obtidos do seqüenciamento dos micro-organismos e a construção da árvore de Neighbor-Joining. Apesar do grande trabalho que teve, ela nunca me disse um não. Esteve sempre disposta a ajudar. A sua contribuição foi fundamental!;

Agradeço profundamente aos meus pais, Renato e Ana, que são tudo de mais preciosos nessa vida e a quem devo tudo que sou e tudo que consegui. Obrigada pelo amor incondicional e por sempre quererem o meu melhor!;

Ao meu irmão Yuri, pelo companheirismo e por sempre torcer pelas minhas conquistas;

Ao meu esposo Christiano, por ter me acompanhado desde o início desta caminhada do Doutorado e sempre ter me incentivado nos meus objetivos e torcido pela realização de cada um deles;

A toda minha família que sempre me incentivou com gestos carinhosos, em especial aos meus avós paternos (*in memoriam*) Antônio Garcia Filho e Waldette Conde Garcia e maternos, Antônio Soares Neto e Terezinha Eida Fagundes Soares, que sempre serão fontes de inspiração e de ser humanos exemplares em que me espelho;

De uma forma geral, gostaria de agradecer a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram nessa caminhada de 4 anos, com o seguinte trecho a seguir:

*“Aos que se tornaram familiares, aos que nasceram familiares e aos que conheci
antes de ontem;*

Aos que me deixaram louca e aos que enlouqueci;

Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha chatice;

Aos amigos que passaram e aos que estagnaram em mim;

Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;

Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;

Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim.

Esse trabalho é a soma de todos vocês.

E se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos.”

(Efraim Rodrigues)

RESUMO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos poluentes formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos, que possuem risco significativo de contaminação da biota por apresentar propriedades tóxicas. Devido a isso, a Agência de Proteção Ambiental Americana selecionou 16 HPAs prioritários para o monitoramento ambiental, dentre eles o Fluoranteno. Uma das formas de se remediar estes compostos do ambiente é pela biodegradação. Nesse contexto, a procura por novas fontes naturais de micro-organismos é de suma importância. Uma das possíveis fontes promissoras é a turfa, a qual consiste em um solo orgânico formado através de oxidação microbiológica de restos de plantas. Além do enorme *pool* biológico e genético que pode ser explorado diretamente desse recurso natural, aplicações biotecnológicas com o uso de células microbianas imobilizadas também são uma vertente que tem ganhado importância. Diante disso, este estudo propõe investigar a biodegradação *in vitro* do fluoranteno utilizando micro-organismos isolados da turfa de Santo Amaro das Brotas - Sergipe, assim como desenvolver um bioproduto centrado na produção de esferas de quitosana imobilizadas com bactéria para o mesmo fim. Utilizando este HPA como única fonte de carbono, foi possível isolar 8 bactérias e 3 fungos, os quais foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. Todos eles foram testados quanto à sua capacidade em degradar o fluoranteno (100 mg L^{-1}) durante diferentes períodos de incubação: 5 e 10 dias para as bactérias; 14 e 28 dias para fungos. Foi verificado que a duração do período de incubação foi proporcional ao grau de biodegradação. As melhores taxas de biodegradação entre as bactérias e os fungos foram alcançadas, respectivamente, pelo isolado *Bacillus* sp. AC-25 em 10 dias (49%) e pelo *Penicillium* sp. AC-1 em 28 dias (64%). A análise dos metabólitos identificou a presença de compostos com diferentes grupos funcionais, incluindo três metabólitos comuns a todos os micro-organismos: 2,3-dimetil-9H-fluoreno-9-ona, carbazol, e bis (octil) benzeno-1,2-dicarboxilato. Em geral, foi possível observar a formação de metabólitos alifáticos, provavelmente, mostrando uma particularidade no metabolismo destes micro-organismos, o qual está relacionado ao ambiente da turfa. Com relação à imobilização em esferas de quitosana, foi observado que o isolado *Serratia* sp. AC-11 foi o que melhor se adaptou as condições necessárias. Estas esferas imobilizadas produzidas foram caracterizadas por MEV e FT-IR. Em apenas 1 dia, elas foram capazes de degradar 56% do fluoranteno, 76% em 5 dias e 84% em 10 dias, apresentando uma taxa de degradação de quase 50% a mais quando comparada a célula livre. Além disso, estas esferas apresentaram a vantagem de reutilização durante ciclos contínuos com biodegradação satisfatória do HPA. Diante dos resultados obtidos, observa-se que a turfa foi uma fonte útil de micro-organismos capazes de degradar o fluoranteno e possibilitou a geração de um novo bioproduto caracterizado principalmente por ser eco-amigável, possuir baixo custo associado, eficiência de degradação e possível aplicação industrial destinado a biorremediação de áreas contaminadas por HPAs.

Palavras- Chave: Fluoranteno, Bactéria, Fungo, Imobilização Celular, Quitosana

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of fused-ring aromatic compounds that are ubiquitous environmental pollutants due to their toxic properties. The importance of preventing PAHs contamination has been recognized by the United States Environmental Protection Agency which has proposed 16 PAHs as priority pollutants, including fluoranthene. Biodegradation is considered as one of the major removal ways of these compounds. In this context, the search for new sources of natural microorganisms is extremely important. One of the most promising source is Peat, which consists in an organic soil formed through a complex process of decomposition and humification of plant residues by microbial oxidation. In addition to the huge biological and genetic pool which can be explored directly from this natural resource, biotechnologic applications using immobilized microbial cells is also an aspect that has gained importance due to various advantages. Thus, this study aims to investigate the biodegradation of *in vitro* fluoranthene using microorganisms isolated from Santo Amaro das Brotas peat-Sergipe, as well as, develop immobilized chitosan beads for the same purpose. Using this PAH as sole carbon source, it was possible to isolate 8 bacteria and 3 fungi identified as belonging to *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. All strains were tested for their ability to degrade 100 mg L⁻¹ of fluoranthene during different incubation periods: 5 and 10 days for bacteria, and 14 and 28 days for fungi. It was found that the duration of the incubation period was proportional to the degree of biodegradation. Analysis of metabolites enabled identification of three compounds common to all the microorganisms: 2,3-dimethyl-9H-fluorene-9-one, carbazole, and bis (octyl) benzene-1,2-dicarboxylate. In general, it was possible to observe the formation of aliphatic metabolites, probably showing a particular feature of these microorganisms from tropical peat. Regarding to microbial immobilization, the *Serratia* sp. AC-11 strain was selected for trapping in chitosan beads that were then used to biodegrade fluoranthene (at 100 mg L⁻¹). The beads produced were uniform in size, with an average diameter of 3 mm, and were characterized by SEM and FT-IR. The immobilized bacteria were able to degrade 76% of fluoranthene in 5 days and 84% in 10 days, at a degradation rate that was almost 50% higher than achieved using free-living cells. Furthermore, the beads with immobilized bacteria had the advantage of being reusable, with satisfactory biodegradation obtained during continuous cycles of use. The numbers of viable cells in the chitosan beads revealed the capacity of the strain to grow and multiply during the biodegradation process. The findings revealed that the peat environment could provide a useful source of PAH-degrading microorganisms. The new bioproduct produced represents a low cost, efficient, eco-friendly, and practical solution for use in the bioremediation of areas contaminated by fluoranthene.

Keywords: Fluoranthene, Bacteria, Fungi, Cell Immobilization, Chitosan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos 16 HPAs indicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana para monitoramento prioritário. Fonte: Adaptado de USEPA, 1993.....	19
Figura 2. Esquema do mecanismo de formação do HPAs através da pirólise (Costa, 2013).	23
Figura 4. Formação dos adutos de DNA devido a reatividade do benzo[a]pireno (Adaptado de VOLLHARDT; SCHORE, 2004).....	24
Figura 5. Vias de degradação de HPAs por fungos e bactérias (Adaptado de BAMFORTH; SINGLETON, 2005).	28
Figura 6. Vias propostas para a biodegradação do fluoranteno por bactérias (PENG et al., 2008).....	30
Figura 7. Localização do município de Santo Amaro das Brotas no mapa do Estado de Sergipe e foto local da turfeira. Foto: Anuska Garcia.	35
Figura 8. Cobertura vegetal (A) e solo (B) da turfeira de Santo Amaro das Brotas. Fotos: Anuska Garcia.....	35
Figura 9. Métodos de Imobilização Celular de acordo com Bickerstaff (1997).	38
Figura 10. Estrutura molecular da quitina e da quitosana (Azevedo <i>et al.</i> , 2007).	39
Figura 11. Eletroforese dos fragmentos de 450 pares de bases relativos à PCR do gene 16S rRNA.....	54
Figura 12. Eletroforese dos fragmentos de 645 pares de bases relativos à PCR do gene 18S rRNA.....	55
Figura 13. Árvore de agrupamento de Neighbor-Joining, construída com distância p e 1000 bootstrap, para sequência parcial do gene 16S das bactérias isoladas e outras sequências de bactérias encontradas no GenBank.....	58
Figura 14. Árvore de agrupamento de Neighbor-Joining, construída com distância p e 1000 bootstrap, para sequência parcial do gene 18S dos fungos isolados e outras sequências de fungos encontradas no GenBank.....	59
Figura 15. Isolados bacterianos selecionados: (A) <i>Bacillus</i> sp. AC-19; (B) <i>Serratia</i> sp. AC-11; (C) <i>Bacillus</i> sp. AC-25.	60

Figura 16. Isolados fúngicos selecionados: (A) <i>Penicillium</i> sp. AC-1; (B) <i>Penicillium</i> sp. AC-6; (C) <i>Fusarium</i> sp. AC-7.	60
Figura 17. Curva analítica e equação da reta para o fluoranteno.....	61
Figura 18. Gráfico da porcentagem de biodegradação do fluoranteno (100 mg L ⁻¹) com as bactérias isoladas da turfa após período de incubação de 5 dias. Os valores são representados pela média e as barras de erro representam o desvio padrão amostral.	62
Figura 19. Porcentagem de degradação do fluoranteno para os diferentes períodos de incubação para as bactérias (A) e os fungos (B) isolados da turfa.	63
Figura 20. Curva de crescimento dos isolados bacterianos durante o período de incubação com o fluoranteno.	66
Figura 21. Comparação dos cromatogramas do GC-MS do metabólito bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato para (a) <i>Penicillium</i> sp. AC-1; (b) <i>Penicillium</i> sp. AC-6; (c) <i>Fusarium</i> sp. AC-7 e (d) controle sem a presença de fluoranteno. Período de incubação de 28 dias.	72
Figura 22. Comparação dos cromatogramas do GC-MS do metabólito bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato para (a) <i>Bacillus</i> sp. AC-25; (b) <i>Bacillus</i> sp. AC-19; (c) <i>Serratia</i> sp. AC-11 and (d) controle sem a presença de fluoranteno. Período de incubação de 10 dias.	72
Figura 23. Ensaio do efeito da quitosana (3% a esquerda da placa e 4% a direita da placa) sobre as bactérias isoladas após 1h e 24h de incubação. A: <i>Bacillus</i> sp. AC-25; B: <i>Serratia</i> sp. AC-11 e C: <i>Bacillus</i> sp. AC-19.	74
Figura 24. Aspecto geral das esferas de quitosana imobilizadas com o isolado <i>Serratia</i> sp. AC-11 (A) e diâmetro das esferas produzidas (B).	75
Figura 25. Pesquisa da atividade quitosanásica com inóculo (triplicata) crescido após 5 dias de incubação com esfera imobilizada.	76
Figura 26. Esferas de quitosana imobilizadas com o isolado <i>Serratia</i> sp. AC-11 sem reticulação (A) e reticulada com 0,2% de glutaraldeído por 1h (B).	78

Figura 27. Esfera de quitosana imobilizada com o isolado <i>Serratia</i> sp. AC-11 ao final do período de 10 dias do ensaio de biodegradação do fluoranteno. (A) Esfera sem reticulação; (B) Esfera reticulada com 0,2% de glutaraldeído por 1h.	78
Figura 28. Micrografias das esferas de quitosana sem reticulação: (A1) Sem imobilização com aumento de 100x; (A2) Superfície da esfera sem imobilização, aumento de 1000x; (B1) Esfera imobilizada com aumento de 50x; (B2) Superfície da esfera com imobilização, aumento de 1000x.....	79
Figura 29. Micrografias das esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído: (C1) Sem imobilização com aumento de 100x; (C2) Superfície da esfera sem imobilização, aumento de 1000x; (D1) Esfera imobilizada com aumento de 100x; (D2) Superfície da esfera com imobilização, aumento de 1000x.....	80
Figura 30. Espectros na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) para as amostras de bactéria <i>Serratia</i> sp. AC-11, quitosana (Quit) e esferas de quitosana imobilizadas com a bactéria <i>Serratia</i> sp. AC-11 (Quit-Bac).....	82
Figura 31. Cromatograma obtido por GC-FID do ensaio de degradação do fluoranteno com a esfera de quitosana sem imobilização (controle – 10dias).....	84
Figura 32. Cromatograma obtido por GC-FID do ensaio de biodegradação do fluoranteno com a esfera de quitosana imobilizada com o isolado <i>Serratia</i> sp. AC-11 e reticulada no período de 5 dias (A) e 10 dias (B).	85
Figura 33. Comparação entre a porcentagem de degradação do fluoranteno para a célula livre e imobilizada no período de 5 e 10 dias, respectivamente. A barra de erros representa o desvio padrão amostral.	86
Figura 34. Porcentagem de biodegradação do fluoranteno pelas esferas imobilizadas e reticuladas durante os ciclos contínuos de reutilização. A barra de erro representa o desvio padrão amostral.	89
Figura 35. Esferas imobilizadas após o quinto ciclo de reutilização.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades Físico-Químicas dos HPAs (Adaptado de LATIMER; ZENG, 2003).....	21
Tabela 2.	Principais HPAs e suas propriedades toxicológicas (Adaptado da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer - IARC e NEVES <i>et al.</i> , 2002).....	22
Tabela 3.	Concentrações dos HPAs presentes na água produzida da Estação de Tratamento de Bonsucesso – Sergipe –Brasil. Adaptado de Dórea <i>et al.</i> (2007).....	25
Tabela 4.	Características físico-químicas da Turfa coletada em Santo Amaro das Brotas –SE.	52
Tabela 5.	Características morfológicas dos isolados bacterianos.	53
Tabela 6.	Identificação molecular dos micro-organismos isolados da turfa utilizando o software BLASTn.	56
Tabela 7.	Valores da razão das áreas do Fluoranteno/ Padrão Interno para cada concentração da curva analítica.....	61
Tabela 8.	Peso seco dos micélios fúngicos (g) após os períodos de incubação.....	67
Tabela 9.	Metabólitos identificados originados da biodegradação do fluoranteno por bactérias isoladas da turfa.	69
Tabela 10.	Metabólitos identificados originados da biodegradação do fluoranteno por fungos isolados da turfa.	70
Tabela 11.	Taxa de biodegradação do fluoranteno (100 mg L ⁻¹) pelas esferas de quitosana imobilizadas com a bactéria <i>Serratia</i> sp. AC-11 durante dias consecutivos de incubação e a respectiva contagem de unidades formadoras de colônia (ufc/g).	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bp	Pares de bases
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNTP's	Desorribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	Espectroscopia na região do infra-vermelho com transformada de Fourier
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectometria de Massas
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IPS	Sociedade Internacional de Turfa
KBr	Brometo de Potássio
kV	Quilovolt
mA	Miliamperes
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minutos
NaCl	Cloreto de Sódio
NB	Caldo Nutriente
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
RPM	Rotação por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo
UV-VIS	Espectroscopia no Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	18
3.1.1. Características Físico-Químicas dos HPAs	20
3.1.2. Toxicidade dos HPAs	22
3.1.3. Fluoranteno	24
3.2. Biodegradação de HPAs.....	26
3.2.1. Biodegradação do Fluoranteno	29
3.3. Turfa	31
3.3.1. Turfeira de Santo Amaro das Brotas - Sergipe	34
3.4. Imobilização Celular	36
3.4.1. Imobilização Celular em Quitosana	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Coleta da turfa.....	40
4.2. Isolamento dos Micro-organismos	40
4.2.1. Caracterização Fenotípica.....	41
4.2.2. Identificação Molecular dos Micro-organismos Isolados	42
4.2.2.1. Bactérias: Extração de DNA e PCR	42
4.2.2.2. Fungos: Extração de DNA e PCR	44
4.2.2.3. Análise das sequências obtidas e construção de árvore filogenética.....	44
4.3. Estocagem dos Micro-organismos	45

4.4. Ensaio de Biodegradação do Fluoranteno	45
4.4.1. Ensaio de Biodegradação com Bactéria	45
4.4.2. Ensaio de Biodegradação com Fungo	46
4.5. Análise Cromatográfica.....	47
4.6. Imobilização em Quitosana	48
4.6.1. Avaliação do Efeito da Quitosana Sobre a Linhagem Seleccionada	48
4.6.2. Pesquisa da Atividade Quitosanásica	49
4.6.3. Preparação das Esferas de Quitosana Imobilizada com a Linhagem Seleccionada.....	49
4.6.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	50
4.6.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.6.6. Ensaio de Biodegradação com Célula Imobilizada.....	50
4.6.7. Teste para Reutilização das Esferas Imobilizadas	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Caracterização Físico-Química da Turfa.....	51
5.2. Isolamento e Identificação dos Micro-organismos da Turfa	53
5.3. Análise Cromatográfica do Fluoranteno	60
5.4. Determinação dos Metabólitos	67
5.5. Imobilização da Bactéria em Quitosana	73
5.5.1. Testes Preliminares para escolha da Bactéria a ser Imobilizada.....	73
5.5.2. Imobilização em Esfera de Quitosana	75
5.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	78
5.5.4. Análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	81

5.5.5. Ensaio de Biodegradação com Bactéria Imobilizada na Esfera de Quitosana	83
5.5.6. Reutilização das esferas imobilizadas	88
6. CONCLUSÕES	91
7. PERSPECTIVAS DO TRABALHO	92
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA DISCENTE DURANTE O DOUTORADO	92
9. REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE A.....	108
APÊNDICE B.....	132
ANEXO A	154
ANEXO B	155
ANEXO C	156

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos aromáticos fusionados entre si, formados por dois ou mais anéis polinucleados constituídos apenas por átomos de carbono e hidrogênio (BANDOWE; NKANSAH, 2016). Eles são considerados um dos mais preocupantes poluentes ambientais por possuírem propriedades teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas. Devido a isso, a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) selecionou 16 HPAS prioritários para o monitoramento ambiental (BISHT *et al.*, 2014). Dentre eles está o fluoranteno, o qual é comumente presente em ambientes contaminados por petróleo (MISHRA *et al.*, 2014), sendo forte indicador de contaminação ambiental (PATEL *et al.*, 2009).

De acordo com a sua origem, os HPAs são componentes naturais do petróleo que podem ser lançados no ambiente pela combustão incompleta de combustíveis fósseis, durante as atividades da indústria petrolífera, como o transporte de óleo, ou através de seu derramamento acidental no ambiente marinho, causando sérios danos ambientais, sociais e econômicos. Além disso, também podem ser originados de fontes naturais, como erupções vulcânicas e de fontes biológicas, a partir da síntese por algumas espécies de organismos vivos (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

Segundo dados da literatura, os HPAs podem ser removidos do ambiente por meio de técnicas físico-químicas como adsorção, volatilização, fotólise e degradação química. Entretanto, uma das técnicas que vem chamando grande atenção por sua eficiência, pelo baixo custo e por ser eco-amigável é a biodegradação, a qual utiliza a capacidade metabólica dos micro-organismos para transformar ou até mesmo mineralizar determinados compostos poluentes (LU *et al.*, 2014).

Devido ao importante papel que os micro-organismos desempenham, faz-se necessário a busca por candidatos promissores capazes de catalisar a degradação de hidrocarbonetos, auxiliando em processos de descontaminação ambiental.

Sabe-se que o solo, em geral, é uma das maiores reservas da diversidade microbiana no planeta e essa grande biodiversidade pode ser uma excelente fonte de recurso de produtos naturais para aplicações biotecnológicas (MOCALI; BENEDETTI, 2010). Com base na importância dos solos como fonte de riqueza genética, ainda há poucos estudos sobre sua diversidade microbiana e potencial metabólico. Os registros de trabalhos de filogenia e potenciais produtos metabólicos importantes para a biotecnologia são escassos no continente sul-americano e praticamente inexistentes na

região Nordeste do Brasil, deixando disponível um imensurável, interessante e inexplorado campo de estudo. Estima-se que em 1 g de solo deva existir 10^{10} células bacterianas e uma diversidade de espécies, a depender das características do solo, variando entre 400 a 50.000 (RAYNAUD; NUNAN, 2014). Se acrescentarmos a isto os fungos, este número, no mínimo, dobraria.

Um dos solos ainda pouco explorado e que apresenta potencial promissor é a turfa. Esse é um solo orgânico formado por um complexo processo de decomposição e humificação de resíduos de plantas através de oxidação microbiológica (ROMÃO *et al.*, 2007). Somente o estado de Sergipe possui reserva mineral de 21 turfeiras, distribuídas em quase todo território estadual, do município de Estância até Neópolis, com reserva de turfa estimada em $2,5 \times 10^6$ toneladas de turfa em base seca (Companhia de Pesquisas em Recursos Minerais – CPRM, 2014).

Com relação aos micro-organismos isolados na turfa, a literatura ainda é escassa e falando especificamente da turfa do Estado de Sergipe, não se tem nada de artigo científico publicado até o momento, sendo apenas reportado o trabalho de doutorado desenvolvido por Lucas (2014).

Visto isso, abre-se um enorme *pool* biológico e genético que pode ser explorado na busca de novos micro-organismos capazes de serem utilizados em diversos fins biotecnológicos, como o da biodegradação, incluindo também a busca por novos genes, vias metabólicas inteiras, bem como seus produtos.

Além do uso de células microbianas isoladas para biodegradação, atualmente uma nova aplicação biotecnológica utilizando os micro-organismos vem ganhando destaque: a imobilização celular (IC). Esta consiste no confinamento físico das células em suportes definidos, como por exemplo, a quitosana, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando sua reutilização. Esta técnica apresenta algumas vantagens em relação às células livres, dentre elas a eficiência de biodegradação e a possibilidade de reuso (VIGGIANI *et al.*, 2006).

Diante do exposto, é de elevado interesse a bioprospecção de micro-organismos da turfa capazes de biodegradar HPAs, dentre eles o fluoranteno, além de gerar um novo bioproduto a partir da imobilização desses micro-organismos em esferas de quitosana com o intuito de buscar uma nova forma de biorremediação deste HPA que seja eficiente, economicamente viável e que possua um potencial para a aplicação industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Bioprospectar micro-organismos da turfa de Santo Amaro das Brotas - Sergipe que sejam capazes de biodegradar o fluoranteno *in vitro*, assim como desenvolver esferas de quitosana imobilizadas com micro-organismo isolado para o mesmo fim.

2.2. Objetivos Específicos

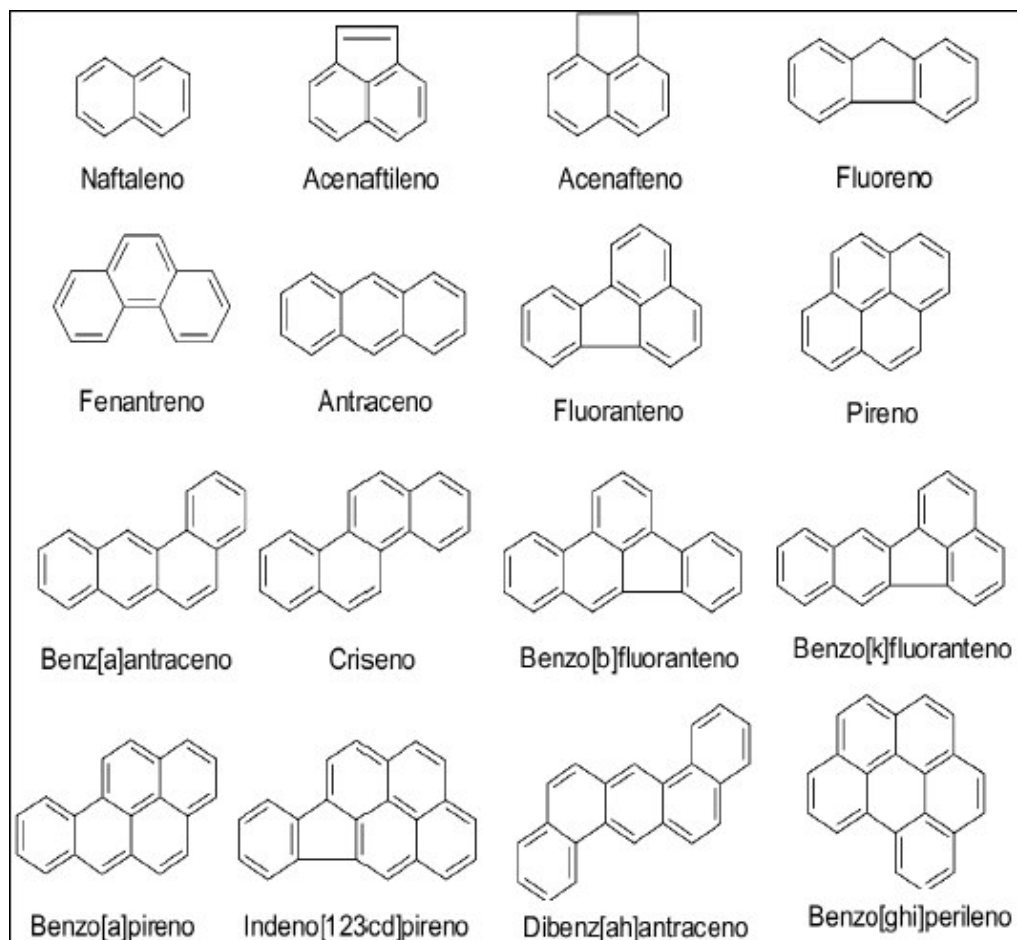
- a) Determinar parâmetros físico-químicos da turfa coletada em Santo Amaro das Brotas/SE;
- b) Isolar e identificar genomicamente os micro-organismos da turfa capazes de crescer em meio contendo apenas o fluoranteno como única fonte de carbono
- c) Avaliar a biodegradação *in vitro* do fluoranteno utilizando as células livres dos micro-organismos isolados;
- d) Selecionar micro-organismos para imobilização em quitosana;
- e) Produzir esferas de quitosana com micro-organismo imobilizado;
- f) Testar a biodegradação do fluoranteno com micro-organismo imobilizado;
- g) Determinar por cromatografia gasosa (GC-FID e GC-MS) a porcentagem de biodegradação e a formação dos metabólitos gerados;
- h) Comparar a eficiência da biodegradação usando micro-organismos livres e imobilizados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os HPAs são uma classe de substâncias orgânicas formadas por dois ou mais anéis benzênicos fusionados constituídos apenas por átomos de carbono e hidrogênio (Figura 1). Eles são formados durante a decomposição térmica de moléculas orgânicas e sua subsequente recomposição. A combustão incompleta em altas temperaturas (500-800°C) ou a exposição de material orgânico a mais baixas temperaturas (100-300 °C) por longos períodos resultam na formação de HPAs (PAZOS *et al.*, 2010).

Figura 1. Estrutura química dos 16 HPAs indicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana para monitoramento prioritário. Fonte: Adaptado de USEPA, 1993.

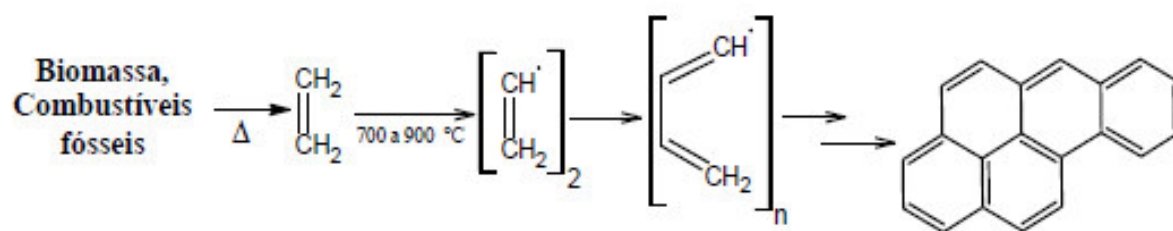


De forma geral, estes compostos podem ser classificados em três diferentes grupos quanto a sua origem: (1) petrogênica, caracterizada pelos HPAs presentes no petróleo e, por conseguinte, em seus derivados; (2) pirogênica, que são os HPAs formados durante os processos da combustão incompleta de matéria orgânica, origem esta influenciada principalmente por fatores como temperatura e pressão que direcionam o perfil constituinte dos HPAs e (3) biológica, caracterizada pelos HPAs sintetizados por organismos vivos (LOCATELLI, 2006).

A formação de HPAs nas fontes pirogênicas é muito complexa e variável. O mecanismo aceito para esta reação consiste na re-polimerização de fragmentos de hidrocarbonetos resultantes da decomposição térmica das moléculas de combustível de cadeias carbônicas de maior extensão (Figura 2). Logo, após a ocorrência da combustão

parcial e do craqueamento, fragmentos contendo dois átomos de carbono (C2), que são predominantes no meio, podem se combinar para formar um radical livre de cadeia C4, o qual pode adicionar outro C2 para formar um anel de seis membros. Tais reações acontecem rapidamente quando um dos fragmentos originais C2 é um radical livre. A reação de re-polimerização ocorre especialmente sob condições deficitárias em oxigênio, sendo que, geralmente, a velocidade de formação dos HPAs aumenta à medida que a razão oxigênio/combustível diminui. Os fragmentos perdem, com frequência, uma pequena quantidade de hidrogênio, que forma água após combinar-se com oxigênio durante as etapas da reação. Assim, fragmentos ricos em carbono combinam-se para formar os HPAs, que são moléculas mais estáveis com razão carbono/hidrogênio elevada. Como o próprio benzeno, a maioria dos HPAs possui geometria planar e alta estabilidade físico-química (LEITE, 2008).

Figura 2. Esquema do mecanismo de formação do HPAs através da pirólise (Costa, 2013).



A migração dos HPAs no ambiente depende de suas características físico-químicas, como por exemplo, capacidade de evaporação e solubilização. Porém, de forma geral, eles podem persistir no ambiente por um longo período e migrar por longas distâncias seja por via atmosférica ou aquática, resultando em uma distribuição global (GUO *et al.*, 2011). A confirmação disso é que os HPAs podem ser detectados em diversos ambientes, entre eles: no ar (CRISTALE *et al.*, 2012), no solo (BORTEY-SAM *et al.*, 2014), no sedimento (WANG *et al.*, 2015), na água superficial (REN *et al.*, 2010), na água subterrânea (VELA *et al.*, 2012), nos alimentos (ALOMIRAH *et al.*, 2011), entre outros.

3.1.1. Características Físico-Químicas dos HPAs

Os HPAs podem apresentar-se como sólidos incolor ou branco/ amarelo claro, com baixa solubilidade em água, bem como, ponto de fusão e ebulição baixos. Com o

aumento na massa molar, a sua solubilidade em água diminui, os pontos de fusão e ebulição aumentam, a pressão de vapor diminui, gerando um aumento na persistência do HPA no ambiente (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

As características físico-químicas dos HPAs, como solubilidade (S) e pressão de vapor (PV), são fatores importantes que direcionam a distribuição desses poluentes entre as fases solúvel e particulada, em meio atmosférico, aquoso e/ou biótico (Tabela 1). A solubilidade dos HPAs varia entre os altamente insolúveis (ex.: benzo[g,h,i]perileno: 0,003 mg L⁻¹) a pouco solúveis (ex.: naftaleno, 31 mg L⁻¹), enquanto a pressão de vapor transita entre compostos altamente voláteis (ex.: naftaleno) a relativamente pouco voláteis (ex.: dibenzo[a,h]antraceno). Com relação às características lipofílicas dos HPAs, seus constituintes são classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis, apresentando coeficientes logarítmicos de partição octanol/água (log K_{ow}) entre 3,37 e 6,75 (LATIMER; ZENG, 2003).

Tabela 1. Propriedades Físico-Químicas dos HPAs (Adaptado de LATIMER; ZENG, 2003)

HPAs	Nº anéis	MM (g mol ⁻¹)	S (mg L ⁻¹)	PV (Pa)	H (Pa m ³ mol ⁻¹)	Log K _{ow}
Naftaleno	2	128	31	10,4	43,01	3,37
Acenaftileno	3	150	16,1	0,9	8,4	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	0,3	12,17	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	0,09	7,87	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,02	3,24	4,57
Antraceno	3	178	0,045	0,001	3,96	4,54
Fluoranteno	4	202	0,26	0,00123	1,037	5,22
Pireno	4	202	0,132	0,0006	0,92	5,18
Benz[a]antraceno	4	228	0,011	0,011	0,581	5,91
Criseno	4	228	-	-	0,065	5,86
Benz[b]fluoranteno	5	252	0,0015	0,00015	-	5,80
Benz[k]fluoranteno	5	252	0,0008	0,0008	0,016	6,00
Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	0,0038	0,046	6,04
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	278	-	-	0,003	-
Dibenzo[a,h]antraceno	5	278	0,0006	0,0006	-	6,75
Benzo[g,h,i]perileno	6	268	0,00026	0,00026	0,075	6,50

Nº: número de anéis aromáticos; MM: massa molar; S: solubilidade, PV: pressão de vapor (Pa – Pascal); H: constante de Henry; Log K_{ow}: coeficiente de partição (octanol/água).

3.1.2. Toxicidade dos HPAs

A grande preocupação com os aspectos toxicológicos dos HPAs deve-se a sua capacidade de reagir direta ou indiretamente com o DNA, sendo amplamente caracterizados como eficientes mutágenos e carcinógenos (JOSEPHY *et al.*, 1997; YU, 2001) (Tabela 2).

Tabela 2. Principais HPAs e suas propriedades toxicológicas (Adaptado da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer - IARC e NEVES *et al.*, 2002).

HPA	Carcinogenicidade (IARC*)	Mutagenicidade**
Benzo[a]antraceno	Grupo 2B	P
Benzo[b]fluoranteno	Grupo 2B	P
Benzo[j]fluoranteno	Grupo 2B	P
Benzo[k]fluoranteno	Grupo 2B	P
Benzo[a]pireno	Grupo 1	P
Criseno	Grupo 2B	P
Dibenzo[a,c]antraceno	Grupo 3	P
Dibenzo[a,h]antraceno	Grupo 2A	P
Dibenzo[a,i]antraceno	Grupo 3	P
Fluoranteno	Grupo 3	P
Fluoreno	Grupo 3	N
Naftaleno	Grupo 3	N
Pireno	Grupo 3	P
Antraceno	Grupo 3	N

* IARC= International Agency for Research on Cancer ; 2A = Provável carcinogênico para humanos – limitada evidência em humanos e suficiente em animais; 2B = Possível carcinogênico para humanos – limitada evidência em humanos e insuficiente em animais; 3 = Não é classificado como carcinogênico para humanos

** Mutagenicidade no teste de Ames: resultados positivos (P) ou negativos (N).

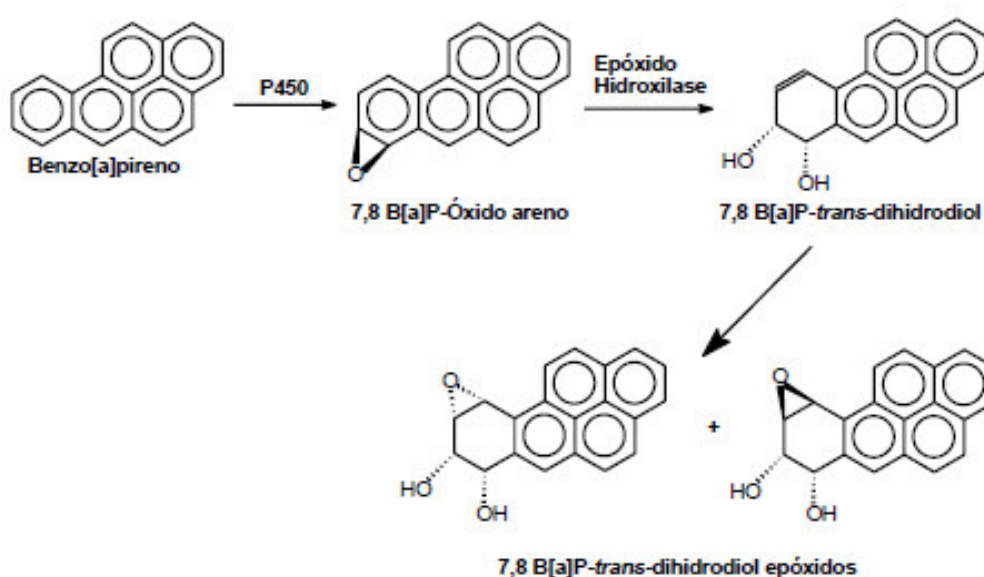
A exposição pode ocorrer por inalação, exposição oral ou dérmica. A quantidade absorvida por inalação depende do grau de contaminação atmosférica, que está diretamente relacionado à urbanização, tráfego de veículos e industrialização do local. A absorção dérmica é importante em pessoas que trabalham em atividades geradoras de HPAs. Os alimentos são considerados outra importante fonte de exposição devido à formação de HPAs durante o cozimento e a deposição atmosférica, por exemplo (JACQUES *et al.*, 2007).

Em vista da característica fortemente apolar, os HPAs são lipossolúveis e prontamente absorvidos no organismo dos animais com posterior acúmulo no tecido adiposo, podendo também ser absorvidos pelos pulmões, intestinos e pela pele de animais experimentais, independente da rota de administração. Níveis detectáveis de HPAs podem ser observados em muitos órgãos internos de minutos a horas da administração (JACQUES *et al.*, 2007; MEIRE *et al.*, 2007).

Ao entrar em contato com o organismo, os HPAs sofrem biotransformações que abrangem uma série de reações de hidrólise, oxidação, redução e conjugação que são realizadas principalmente por enzimas do sistema monooxigenase de função mista da super família do Citocromo P-450 (MEIRE *et al.*, 2007). Uma vez absorvida pela pele, os HPAs são metabolicamente ativados, e desta maneira tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares. A formação de adutos de DNA é considerada essencial na carcinogenicidade desses xenobióticos (YI *et al.*, 2015).

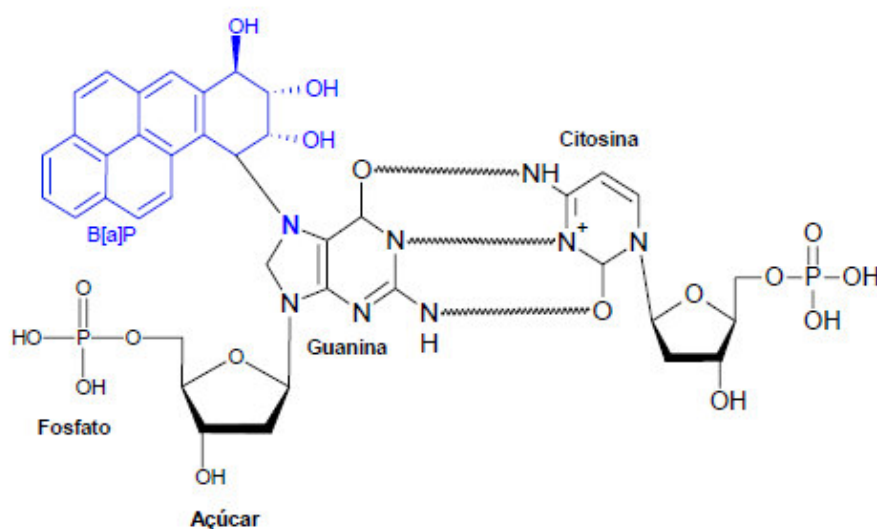
Como exemplo, no caso do benzo[a]pireno, o Citocromo P-450 de mamíferos executa as reações de epoxidação, ocasionando a formação de um benzo[a]pireno-diol epóxido (oxa-ciclo-propano). Os diolepóxidos formados a partir dos HPAs são moléculas reativas, tanto quanto os epóxidos. Eles se adsorvem por mecanismos complexos sobre o DNA e produzem transformações no material genético que estão na base do processo de carcinogênese (AKCHA *et al.*, 2000) (Figura 3).

Figura 3. Esquema da ativação enzimática do benzo[a]pireno em diol epóxidos (Costa, 2013).



Alguns estudos indicam que a atuação do carcinogênico efetivo seja derivado do ataque nucleofílico dos diol epóxidos ao nitrogênio do grupo amina da guanina, uma das bases do DNA. A guanina alterada afeta a dupla hélice do DNA, levando à replicação defeituosa da molécula pela formação de um aduto de DNA (Figura 4) (VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

Figura 4. Formação dos adutos de DNA devido a reatividade do benzo[a]pireno (Adaptado de VOLLHARDT; SCHORE, 2004).



Diversos são os estudos que mostram os efeitos deletérios dos HPAs em diferentes grupos de organismos como moluscos (JIN *et al.*, 2015); peixes (BANDOWE *et al.*, 2014); aves (LUZARDO *et al.*, 2014); répteis (SERESHK; BAKHTIARI, 2014), humanos (WEI *et al.*, 2010; SOLTANI *et al.*, 2015), entre outros, evidenciando a necessidade de mecanismos de remoção desses compostos do ambiente.

3.1.3. Fluoranteno

Dentre a lista da USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) contendo os 16 HPAs prioritários para o monitoramento, chama-se atenção neste trabalho para o fluoranteno.

O fluoranteno é um HPA não alternante, composto por 4 anéis fusionados, sendo um desses anéis formado por 5 membros. Sua estrutura é similar a compostos como dioxina e dibenzofurano. Diversos estudos o utilizam como composto modelo para pesquisas com HPAs de alta massa molecular. Ele está entre os HPAs pirogênicos mais onipresentes e abundantes nos ecossistemas (SÉPIC *et al.*, 2003).

Sua presença no ambiente gera grandes preocupações por apresentar propriedades mutagênicas tanto em células animais quanto humanas (XU *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2014) e possivelmente carcinogênicas e teratogênicas.

De acordo com Patel *et al.* (2009), o fluoranteno é considerado um indicador de poluição, comumente presente em ambientes contaminados por petróleo (LEE *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2014).

Sabe-se que o Estado de Sergipe é o detentor do maior campo de produção de petróleo terrestre e o quarto produtor do Brasil, com uma produção estimada de 3.600 m³ de óleo cru e 28.000 m³ de água produzida, por dia. Uma parte dessa água é re-injetada para aumentar a vida de produção e o resto é utilizado para dissolver os sais gerados pela Companhia Vale do Rio Doce, sendo subsequentemente, descartada nas águas dos rios após o tratamento o qual ocorre na estação de Bonsucesso, na cidade de Carmópolis (Dórea *et al.*, 2007).

Ainda seguindo o mesmo estudo realizado por Dórea *et al.* (2007), no qual foi determinada a composição química da água produzida coletada na estação de tratamento de Bonsucesso (Carmópolis), foram identificadas a presença de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), metais pesados e HPAs. Entre os HPAs, os três que apresentaram maiores médias de concentração foram: naftaleno, criseno e fluoranteno (Tabela 3), todos incluídos na lista da Agência de Proteção Ambiental Americana.

Tabela 3. Concentrações dos HPAs presentes na água produzida da Estação de Tratamento de Bonsucesso – Sergipe –Brasil. Adaptado de Dórea *et al.*(2007).

HPA	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Variação		Média *
	Mínima	Máxima	
Naftaleno	9,9	10,7	10,3
Acenaftileno	1,6	2,4	2
Fenantreno	2,2	2,4	2,3
Antraceno	0,8	1,7	1,3
Fluoranteno	2,7	6,2	4,4
Pireno	0,9	1	0,9
Benzo[a]antraceno	1,6	1,9	1,7
Criseno	5,9	9,9	7,9
Perileno	1,6	2,6	2,1
Benzo[a]pireno	2,4	2,6	2,5
Benzo[g,h,i]perileno	0,9	3,1	2

*n=Triplicata

A escolha especificamente pelo fluoranteno se deu devido a esse apresentar as condições ideais de trabalho, levando em conta o custo do padrão analítico e também a sua baixa volatilidade, o que faz com que ele permaneça em meio líquido sem que haja perdas abióticas consideráveis. Desta forma, evidencia-se a escolha por este HPA como modelo para uso na biodegradação por micro-organismos isolados da turfa.

3.2. Biodegradação de HPAs

Os riscos associados com os HPAs podem ser remediados com a utilização de métodos convencionais que envolvam a remoção, alteração ou isolamento do poluente através de volatilização, fotólise, degradação química, entre outros. Tais técnicas envolvem, por exemplo, a escavação de solo contaminado e sua incineração ou contenção. Estas tecnologias são caras, e, em muitos casos transferem o poluente de um local para outro. Entretanto, uma técnica que vem ganhando muita atenção é a biodegradação por apresentar grande eficiência, baixo custo e por ser eco-amigável (HARITASH;KAUSHIK, 2009; KUMAR *et al.*, 2011).

De acordo com Seo *et al.* (2009) a biodegradação se refere à capacidade metabólica de micro-organismos em degradar contaminantes orgânicos, tendo como objetivo transformá-los em compostos menos nocivos ou até mesmo mineralizá-los a água e gás carbônico que são então integrados a ciclos biogeoquímicos naturais. A biodegradação é considerada o melhor processo de remoção de HPAs de áreas contaminadas, assim como também influencia diretamente o destino dos poluentes em ambientes terrestres e aquáticos (XIANGCHUN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2010).

Tanto bactérias quanto fungos têm sido estudados por sua habilidade de degradação de xenobióticos, inclusive HPAs. A grande diferença no nível de conhecimento sobre o metabolismo de HPAs entre bactérias e fungos pode ser explicada pelo rápido crescimento bacteriano em meio líquido, favorecendo sua seleção e isolamento (CERNIGLIA, 1993).

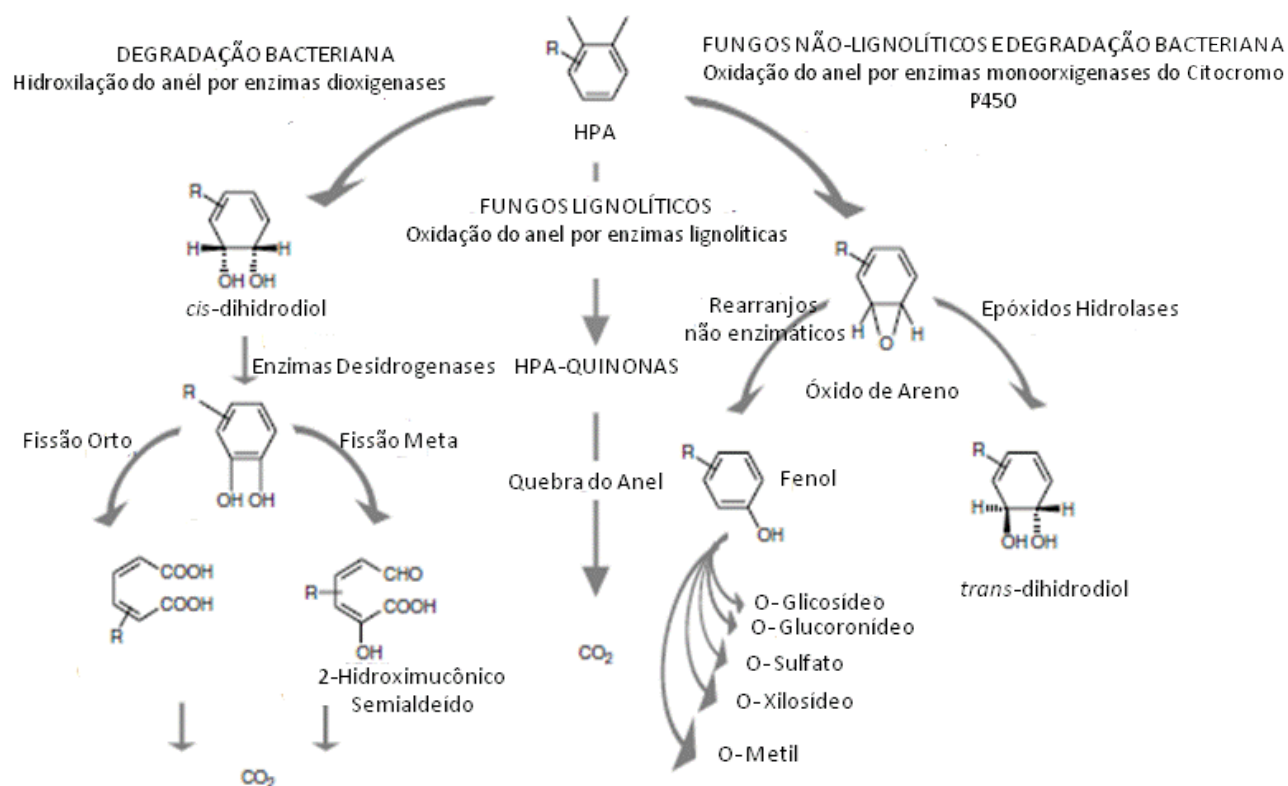
A degradação biológica de HPAs pode ser resultado de três diferentes processos: (i) biodegradação com assimilação do composto, que resulta em carbono e energia ao organismo e conduz à mineralização do HPA ou parte dele; (ii) detoxificação intracelular, que gera metabólitos mais solúveis em água como um pré-requisito para a excreção; (iii) co-metabolismo, que leva à degradação do HPA sem geração de energia e carbono proveniente deste composto para o metabolismo celular.

Segundo alguns autores (CERNIGLIA, 1993; JOHNSEN *et al.*, 2005, PENG *et al.*, 2008), esse co-metabolismo geralmente ocorre mais com os fungos, os quais, na sua grande maioria, não são capazes de utilizar HPAs como única fonte de carbono e energia, mas o transformam co-metabolicamente com outros compostos.

Sabe-se que HPAs de baixa massa molecular (2-3 anéis aromáticos) são facilmente metabolizados pelos micro-organismos em relação aos de massa molecular elevada (4 ou mais anéis) que são lentamente transformados devido à sua grande energia de ressonância, elevada hidrofobicidade que, conseqüentemente, faz com que eles estejam menos biodisponíveis no ambiente devido a forte ligação com as partículas do solo e sedimentos (KANALY; HARAYAMA, 2010). Existe uma relação entre número de anéis, persistência no ambiente e biodegradação. Como exemplo, podemos citar o tempo de meia-vida do fenantreno (3 anéis) em solos e sedimentos que podem variar entre 16 a 126 dias, enquanto que do benzo[a]pireno (5 anéis) pode variar entre 229 a 1400 dias (PENG *et al.*, 2008).

De acordo com Samanta *et al.* (2007), o primeiro passo para a degradação bacteriana de HPAs é a ação da dioxigenase, que incorpora átomos de oxigênio em dois átomos de carbono de um anel benzênico de um HPA resultando na formação de cis-diidrodiol. Em seguida, o cis-diidrodiol é oxidado a catecol, que é substrato para outras dioxigenases que levam à quebra do anel aromático. O caminho oxidativo *orto* envolve a quebra entre os átomos de carbono dos dois grupos hidroxílicos, formando o ácido *cis,cis*-mucônico. No caminho oxidativo *meta* quebra a ligação entre o carbono hidroxilado e o carbono adjacente, formando o 2-hidroximucônico semialdeído (Figura 5). Esses intermediários, subsequentemente, poderão continuar sofrendo clivagens e resultar na produção de succinato, acetil CoA, ácidos pirúvico e acético e aldeídos, os quais são utilizados por microrganismos na síntese de constituintes celulares e energia (Ciclo do Ácido Tricarboxílico - TCA). Uma vez que o primeiro anel aromático hidroxilado do HPA é degradado, o segundo anel é enzimaticamente processado da mesma maneira.

Figura 5. Vias de degradação de HPAs por fungos e bactérias (Adaptado de BAMFORTH; SINGLETON, 2005).



Com relação aos fungos, as principais vias descritas na literatura são duas: a primeira está relacionada aos fungos não-lignolíticos e a segunda aos fungos lignolíticos (Figura 5).

No caso dos fungos não-lignolíticos, o primeiro passo no metabolismo de HPAs é a oxidação do anel aromático catalizada pela enzima monooxigenase do sistema Citocromo P-450 para produção de um óxido de areno (epóxido), assim como ocorre no metabolismo de HPAs por mamíferos. Em comparação à oxidação do anel pela enzima dioxigenase formando *cis*-dihidrodióis, as monooxigenases incorporam somente um átomo de oxigênio para formar um óxido de areno. Através das enzimas epóxido hidrolases, esses óxidos de areno são transformados em *trans*-dihidrodióis, ou um dos anéis pode ser rearranjado não enzimaticamente a um fenol e ser conjugado, originando compostos como glicuronídeos, sulfatos e glicosídeos. O isolamento desses metabólitos de Fase II e a detecção da atividade da enzima transferase correspondente são um indicativo de vias metabólicas de detoxificação, uma vez que os produtos de conjugação

são considerados menos tóxicos do que o HPA de origem (CERNIGLIA, 1997; PENG *et al.*, 2008; MAGRINI, 2012).

Os fungos lignolíticos oxidam o HPA extracelularmente por enzimas não específicas, que são as peroxidases, peroxidases dependentes de manganês e lacases, gerando radicais livres hidroxilas pela doação de um elétron, que oxidam o anel aromático (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Esta reação gera quinonas e ácidos em vez de dihidrodiois (Figura 5). No caso destes fungos, geralmente quinonas são acumuladas como produtos da degradação de HPAs. Sabe-se que as enzimas lignolíticas, como as lacases, podem somente clivar o anel aromático sem induzir a mineralização do HPA (CERNIGLIA, 1997; MAGRINI, 2012). Entretanto, segundo Bamforth e Singleton (2005) para completar a mineralização do composto, fungos lignolíticos utilizam também as monooxigenases do citocromo P-450, epóxido hidrolases em conjunto com suas enzimas lignolíticas.

Na literatura é relatado um expressivo número de micro-organismos com potencial biodegradador de HPAs isolados de diferentes ambientes contaminados (SAMANTA *et al.*, 2007; PENG *et al.*, 2008; HARITSH; KAUSHIK, 2009; SEO *et al.*, 2009). A escolha primordial pelo isolamento advindo de ambientes com histórico de contaminação se dá principalmente pelo fato da microbiota presente ali possuir a adaptação metabólica necessária para sua sobrevivência.

Como exemplos, podem-se citar espécies do gênero *Sphingomonas sp.* que foram isoladas de solo contaminado na Argentina e apresentaram capacidade de degradar fluoranteno, pireno, fenantreno e antraceno (MADUEÑO *et al.*, 2011). *Bacillus fusiformes* foi isolado da água residual do refino de petróleo na China e apresentou capacidade de 96% de degradação do naftaleno (LIN *et al.*, 2010). O fungo *Cyclothyrium sp.*, isolado de sedimento estuarino contaminado por petróleo, foi capaz de degradar significativamente naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno e benzo[a]pireno (SILVA *et al.*, 2004). Wu *et al.* (2010) isolaram *Fusarium solani* do sedimento contaminado de mangue e avaliaram a eficiência de biodegradação com o antraceno e benzo[a]antraceno.

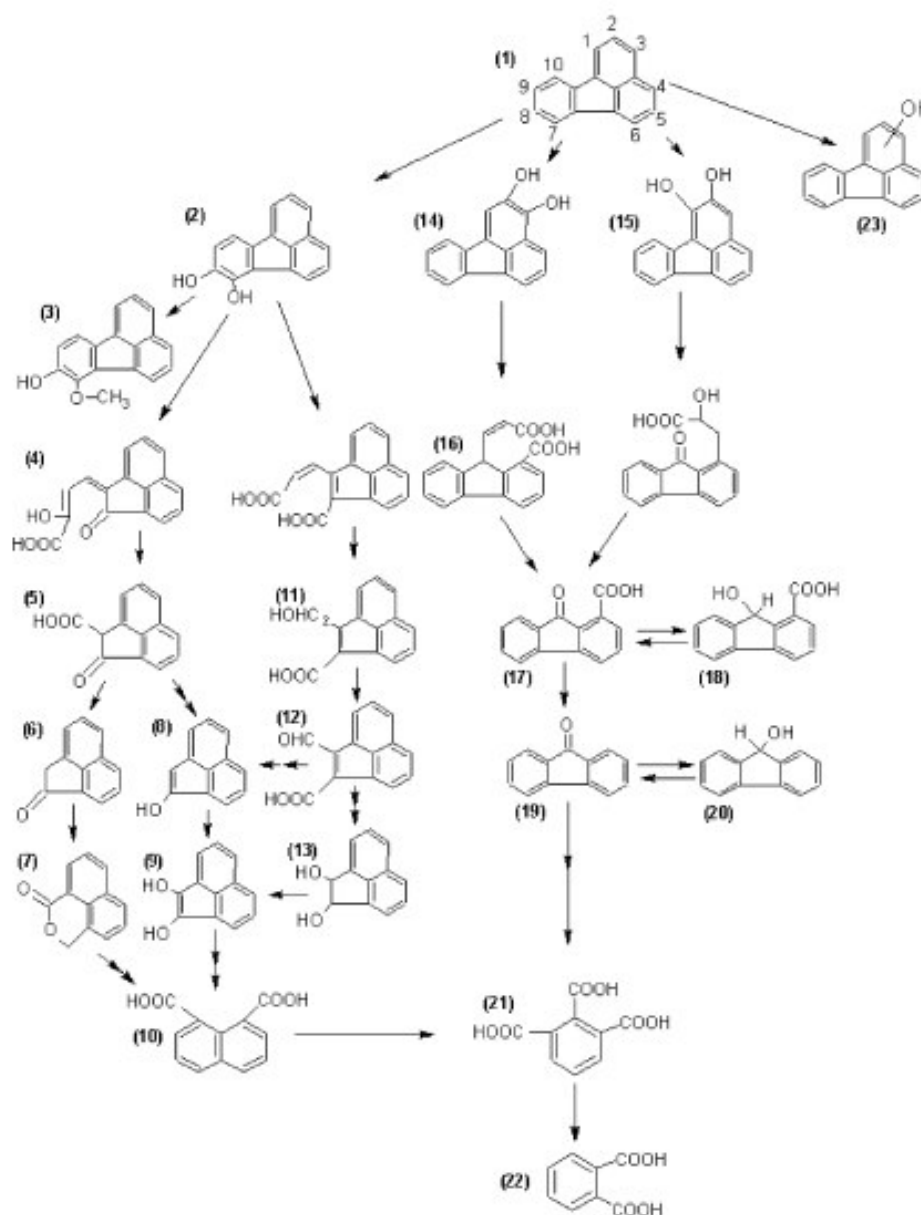
3.2.1. Biodegradação do Fluoranteno

A utilização do fluoranteno como fonte de carbono e energia para linhagens bacterianas primeiramente foi descrito por Weiuenfels *et al.* (1990) e Mueller *et al.* (1990). Atualmente, existem estudos que utilizam este HPA para biodegradação tanto

utilizando bactérias (LEE *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2015;) quanto fungos (SALICIS *et al.*, 1999; GIRAUD *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2011).

Com o aumento do uso do fluoranteno em ensaios de biodegradação, rotas metabólicas completas estão sendo cada vez mais e melhor elucidadas, mostrando não só metabólitos identificados como também as suas vias de formação. Na Figura 6 está a rota detalhada de biodegradação por bactérias proposta por Peng *et al* (2008).

Figura 6. Vias propostas para a biodegradação do fluoranteno por bactérias (PENG *et al.*, 2008).



Estruturas moleculares de acordo com Peng *et al.* (2008) (Figura 6): fluoranteno (1), 7,8-dihidroxi fluoranteno (2), 7-metoxi-8-hidroxi-fluoranteno (3), (2Z, 4Z)-2-hidroxi-4-(2-oxoacenaftilen-1(2H)-ilideno) but-2-enoic ácido (4), 1-acenaftenona-2-carboxílico ácido (5), acenaftileno-1(2H)-one (6), 1H,3H-benzo[de] isocromen-1-ona (7), acenaftilen-1-ol (8), acenaftilen-1,2-diol (9), naftaleno-1,8-dicarboxílico ácido (10), 2-(hidroximetil)-acenaftileno-1-carboxílico ácido (11), 2-formilacenaftileno-1-carboxílico ácido (12), 1,2-dihidroacenaftileno-1,2-diol (13), 2,3-dihidroxi fluoranteno (14), 1,2-dihidroxi fluoranteno (15), (9E)-9 (carboximetileno)-9H-fluorena-1-carboxílico ácido (16), 9-fluorenona-1-carboxílico ácido (17), 9-hidróxi-9H-fluorena-1-carboxílico ácido (18), 9-fluorenona (19), 9-hidroxifluoreno (20), 1,2,3-benzenetricarboxílico ácido (21), ácido ftálico (24), e monohidroxifluoranteno (22).

O recente estudo de Cao *et al.* (2015), além de também propor vias de biodegradação utilizando a bactéria *Celeribacter indicus* P73, fizeram o mapeamento completo do genoma desta bactéria, mostrando que dos seus 138 genes, 14 podem expressar a enzima dioxigenase, a qual está envolvida no processo de biodegradação de HPAs.

Visto isso, a descoberta não só de novos micro-organismos, como também de novas fontes de isolamento, contribuem para a ampliação do conhecimento relativo aos aspectos genéticos e metabólicos para fins biotecnológicos de biodegradação de locais contaminados.

3.3. Turfa

A turfa é um solo orgânico formado continuamente por um complexo processo de decomposição e humificação de resíduos de plantas através de oxidação microbológica. Durante este processo de formação, o material vegetal perde gradativamente sua estrutura primária, originando produtos intermediários, que reagem novamente e se polimerizam, formando compostos de estruturas complexas, decorrendo em um enriquecimento contínuo de carbono (VALLADARES *et al.*, 2007). A turfa pode ser encontrada em áreas alagadiças como várzeas de rios, planícies costeiras e regiões lacustres (MOHAN; PITTMAN, 2006; ROMÃO *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2009).

Devido a sua extrema dinâmica e variedade natural, características químicas da turfa podem variar muito entre os diferentes depósitos encontrados (ROMÃO *et al.*, 2007). Entretanto, apesar dessas diferenças, existem constituintes que são intrínsecos,

entre eles estão: lignina, celulose e substâncias húmicas (SHs). As SHs são os principais componentes da matéria orgânica do solo (MOS), representando 2/3 do carbono orgânico. As três principais frações das substâncias húmicas presentes na turfa são definidas operacionalmente em termos de suas solubilidades, a saber: ácidos húmicos, consistem na fração solúvel em meio alcalino; ácidos fúlvicos, fração solúvel em água sob todas as condições de pH e a humina, definida como a fração insolúvel em solução aquosa em qualquer pH. A humina representa o residual da matéria orgânica do solo após a remoção dos ácidos húmicos e fúlvicos (DRORI *et al.*, 2008).

As SHs desempenham um papel importante no ambiente pela capacidade de interagir com a maioria dos íons metálicos para formar complexos com diferentes estabilidades e características estruturais (SANTOS *et al.*, 2007). Esta capacidade é devido à grande quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio, incluindo carboxila, hidroxila fenólica e carbonila (STEVENSON, 1994). As SHs também interagem com óxidos, hidróxidos, minerais e compostos orgânicos para formar compostos que são solúveis ou insolúveis em água com diferentes estabilidades químicas e biológicas.

Estima-se que 4 milhões de quilômetros quadrados do globo terrestre são cobertos por turfeiras (aproximadamente 3% do planeta) (MOORE, 2002), contribuindo com cerca de 700 milhões de toneladas de carbono orgânico refratário nos ambientes (ROSA *et al.*, 2001). Para a Sociedade Internacional de Turfa (International Peat Society - IPS), mais de 90% das turfeiras do mundo situam-se nos cinturões frios e temperados do Hemisfério Norte, o remanescente concentra-se em latitudes tropicais e subtropicais, em sua maioria em ambientes florestais. A Rússia detém cerca de 60% das reservas mundiais conhecidas deste solo (GORE, 1983), enquanto o Brasil possui reservas estimadas em 1,6 bilhões de metros cúbicos distribuídos em mais de duzentas turfeiras ao longo de seu território (SANCHES *et al.*, 2007).

No Brasil, o histórico de sua utilização remonta à época da Segunda Grande Guerra, quando a Estrada de Ferro Central do Brasil foi autorizada a explorar algumas turfeiras no Vale do Paraíba para mover suas locomotivas, independentemente das formalidades exigidas pelo Código de Minas, em virtude de interrupções no fornecimento do carvão mineral importado (Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT 1979). A importância da turfa para o Brasil restringiu-se, prioritariamente, à possibilidade de vir a participar da matriz energética nacional em períodos específicos das décadas de 1970 e 80, função da crise mundial do petróleo.

Neste contexto, é digno de nota o trabalho desenvolvido pelo Departamento Nacional da Produção Mineral - DNPM - através da Companhia de Pesquisas de Recursos Minerais - CPRM -, que culminou com a descoberta de inúmeras turfeiras no território nacional como fruto de vários projetos de prospecção regional, especialmente nas faixas litorâneas: Região Sul, Sudeste, Centro Oeste, Região do Alto São Francisco, Faixa Costeira da Bahia e Sergipe, Nordeste Oriental (AL, PE, PB, RN) e Nordeste Setentrional (MA, PI, CE) (FRANCHI; SÍGOLO; LIMA, 2003).

De forma geral, a turfa apresenta características físico-químicas, como por exemplo, alta porosidade, área específica e uma diversidade de grupos funcionais presentes na substância húmica, que fazem com que ela possa ser aplicada em diferentes áreas específicas. Pesquisas nos últimos anos apontaram o uso da turfa como alternativa de adubação para agricultura de pequeno e grande porte no Brasil (SILVA *et al.*, 2011). No entanto, sua utilização tem sido muito mais ampla, sendo usada, por exemplo, para a produção de combustível (XU; DONALD, 2012) e, principalmente, para processos de remoção de compostos poluentes.

Na literatura existem vários trabalhos utilizando o solo da turfa para remoção de diferentes classes de compostos poluentes. Ela tem sido largamente pesquisada para aplicação no tratamento de efluentes (PATTERSON *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2001; CLAUDINO, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004), devido à sua alta capacidade de adsorção. Também tem sido utilizada para remediação de locais contaminados por metais pesados (FRANCHI, 2004). Liu *et al.* (2008) estudaram a eficiência da turfa na remediação dos metais cobre, cádmio e níquel. Batista *et al.* (2009) realizaram estudos de adsorção empregando turfa *in natura* e quimicamente modificada para remoção de Cr (III). Sun e Yang (2003) e Fernandes *et al.* (2007) avaliaram a eficiência da turfa na adsorção de diferentes categorias de corantes reativos têxteis. Cunha *et al.* (2010) testaram para adsorção de trihalometanos. Kumar e Philip (2006) afirmaram que a matéria orgânica presente no solo de turfeiras desempenhou um importante papel na sorção de agroquímicos clorados. Com relação à remoção de HPAs, o estudo realizado por Conte *et al.* (2001) demonstrou que a persistência deles no solo pode ser controlada pelas substâncias húmicas presentes na turfa. Tanaka *et al.* (1997) avaliaram a solubilidade do pireno na água e observaram que esta foi aumentada com a presença das substâncias húmicas.

3.3.1. Turfeira de Santo Amaro das Brotas - Sergipe

Com relação ao Estado de Sergipe, a incidência de jazimentos de turfa na faixa costeira representa um recurso natural com boas perspectivas de aproveitamento econômico. Essas turfeiras situam-se nas planícies costeiras ou nas planícies de inundação. Aquelas localizadas nas planícies costeiras depositaram-se em paleolagunas relacionadas a cordões litorâneos (turfeiras parálicas). As de planícies de inundação desenvolveram-se em zonas alagadiças (paleolagoas) fora da área de influência das marés (turfeiras límnicas).

O Estado possui uma reserva mineral de 21 turfeiras distribuídas em quase todo território estadual, indo de Estância até Neópolis (SANTOS *et al.*, 2001), onde estima-se uma reserva geológica, em base seca, da ordem de $2,5 \times 10^6$ toneladas de turfa, de acordo com a Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM), sendo que 8% deste total encontra-se localizada na cidade de Santo Amaro das Brotas.

Este município está localizado no setor leste do estado de Sergipe, limitando-se a norte com os municípios de Rosário do Catete, General Maynard, Carmópolis e Pirambu, a sul com Nossa Senhora do Socorro e Aracaju, a oeste com Maruim e Laranjeiras e a leste com Barra dos Coqueiros. Apresenta clima tropical úmido e sub-úmido, temperatura média anual de $25,3^{\circ}\text{C}$, precipitação pluviométrica anual de 1.466,5 mm e período chuvoso de março a agosto. O relevo está representado pela planície litorânea e pelo tabuleiro costeiro com relevos dissecados dos tipos colina e interflúvios tabulares (BONFIM; COSTA; BEVENUTTI, 2002).

A turfeira de Santo Amaro das Brotas é um ambiente lagunar, implantada sobre os cordões pleistocênicos, sendo considerada então como uma turfeira parálica. De acordo com Lima (1992), esta turfeira possui vegetação típica representada por pteridófitas, briófitas (*Sphagnum*) e ciperáceas, sendo que esta última predomina no estrato herbáceo de cobertura. Seu solo de coloração escura, devido ao acúmulo de matéria orgânica, apresenta-se constantemente alagado (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Localização do município de Santo Amaro das Brotas no mapa do Estado de Sergipe e foto local da turfeira. Foto: Anuska Garcia.

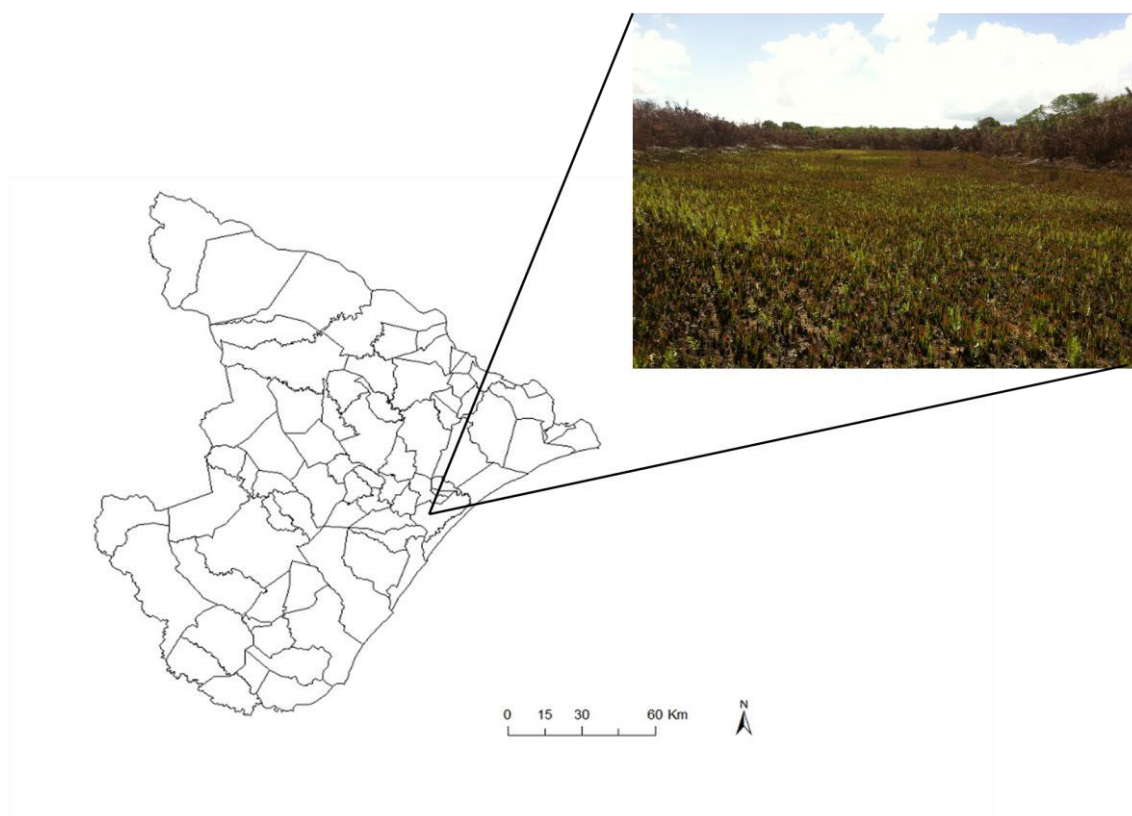
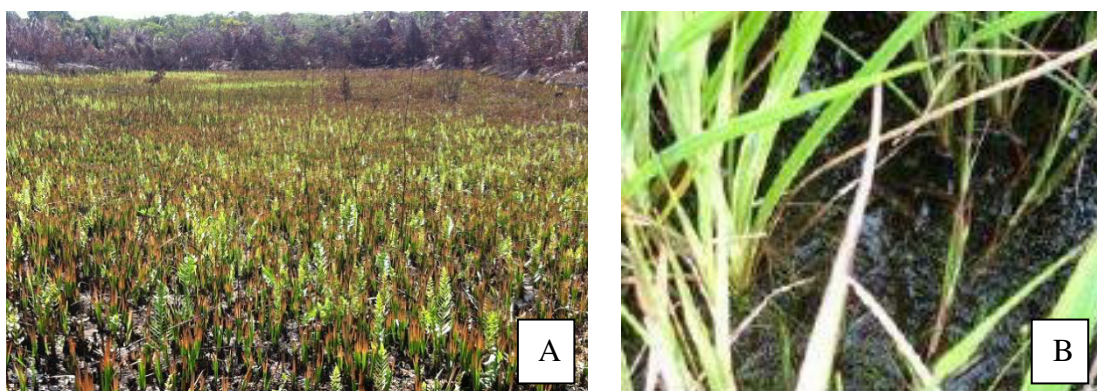


Figura 8. Cobertura vegetal (A) e solo (B) da turfeira de Santo Amaro das Brotas. Fotos: Anuska Garcia.



As características espectroscópicas e microscópicas dessa turfeira foram elucidadas por Romão *et al.* (2007). A partir de então diversos foram os trabalhos que utilizaram a turfa de Santo Amaro como material adsorvente para pesticidas (CARVALHO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012), BTEX (COSTA *et al.*, 2012), crômio (CERQUEIRA *et al.*, 2012), trihalometanos (CUNHA *et al.*, 2010) e corantes (JESUS

et al., 2011), mostrando a aplicabilidade desta turfeira para remediação de compostos poluentes tanto orgânicos quanto inorgânicos.

Sabe-se que a formação da turfa envolve complexos processos de decomposição microbológica, abrindo-se um enorme leque para estudos da microbiota presente nesta turfeira. Entretanto, apesar de já ter sido estudada sobre as suas propriedades e diversas aplicações como adsorvente, como já visto acima, com relação aos aspectos relacionados a sua microbiota na literatura existe apenas o recente trabalho de Lucas (2014), no qual foi realizado a metagenômica deste solo, assim como, bactérias foram isoladas para a utilização na biodegradação dos pesticidas tiametoxam e tiacloprido.

De acordo com este estudo, a análise metagenômica apresentou sequências que revelaram a presença de 11 filos de bactéria, com predominância de *Proteobacteria* (50%) seguido de *Acidobacteria* (17%). O domínio *Archaea* foi constituído por dois filos, o *Crenarchaeota* (60%) e o *Euriarchaeota* (40%). Dentre as bactérias isoladas, foi possível a identificação molecular de uma delas como *Bacillus thuringiensis* serovar e uma outra bactéria selecionada para os ensaios de biodegradação, a R5RaNB, foi capaz de degradar 86% de tiametoxam e 47% de tiacloprido nas condições estudadas.

Como visto, a turfeira de Santo Amaro das Brotas apresenta um enorme potencial especialmente com relação a sua microbiota, que deve ser mais explorada para o uso em diversas aplicações biotecnológicas.

3.4. Imobilização Celular

A imobilização celular é uma técnica que vem crescendo atualmente. Ela oferece um potencial promissor na melhoria da eficiência de bioprocessos. De modo geral, consiste em “aprisionar” um micro-organismo em determinada matriz chamada suporte. Com o uso dessas células imobilizadas com diferentes organismos, observou-se uma melhor eficiência em processos de biotransformação (GUO *et al.*, 2006), biodegradação (VIGGIANI *et al.*, 2006) e produção de enzima (PRASAD *et al.*, 2005).

Segundo Kennedy e Cabral (1987) não existe um suporte universal, porém características desejáveis devem estar presentes no material a ser utilizado na imobilização como: grande área superficial; permeabilidade; características hidrofílicas; insolubilidade; estabilidades térmica, física e química; alta rigidez; resistência ao ataque microbiano; regenerabilidade e forma e tamanho da partícula adequados. Diversos suportes já foram utilizados para a imobilização de micro-organismos, dentre eles:

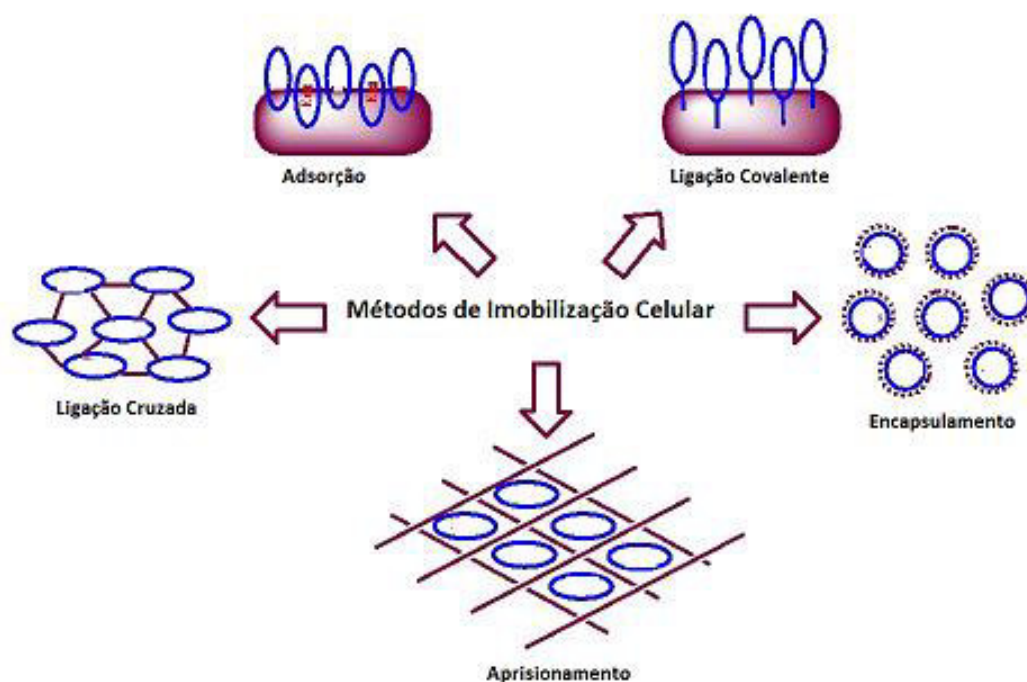
silicone (BERGAMAIER *et al.* 2005), náilon (SEDARATI *et al.*, 2003), quitosana, sílica, sílica gel e xerogel (ROCHA *et al.*, 2012), entre outros.

Diversas são as vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres, entre elas: recuperação mais fácil de produtos e estas estando livres de contaminação com biomassa; os processos envolvendo células imobilizadas são mais eficientes na utilização do substrato e biomassa; podem ser usados em processos contínuos, com o uso de altas densidades de células; existe uma maior resistência dessas células imobilizadas às adversidades impostas pelo meio; há a possibilidade de reutilização (COVIZZI *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2014).

Embora apresente algumas desvantagens, o uso de células microbianas imobilizadas é compensado pelas vantagens que o método proporciona. O processo de imobilização pode não ser econômico e as limitações de transferência de massa podem afetar a fisiologia e a cinética do crescimento celular. Além disso, a matriz utilizada pode se romper devido ao crescimento celular e evolução de gases, devido às limitações na transferência de oxigênio (WANG *et al.*, 2005). Assim, para que a imobilização celular apresente sucesso, é necessário escolher adequadamente a metodologia a ser utilizada.

De forma geral, as células podem ser imobilizadas de duas maneiras, aprisionamento ou aderência à superfície. Na primeira, os organismos são aprisionados nos interstícios fibrosos ou porosos do suporte. No segundo caso, os micro-organismos aderem à superfície diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) (COUTO *et al.*, 2004). Segundo Bickerstaff (1997) existem cinco métodos principais de imobilização de células e enzimas: adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, encapsulamento e aprisionamento (Figura 9).

Figura 9. Métodos de Imobilização Celular de acordo com Bickerstaff (1997).



Dentre os métodos anteriormente citados, o encapsulamento tem se destacado com sucesso por garantir maior proteção às variações ambientais e viabilidade dos micro-organismos (ADINARAYANA *et al.*, 2005; ANGELIM *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014). O encapsulamento consiste no envolvimento dos componentes biológicos em uma membrana semipermeável, sendo similar ao método do aprisionamento, em que as células estão livres na solução, mas restritas ao espaço (COSTA, 2006).

Neste processo, as células microbianas ficam aprisionadas no interior de uma matriz polimérica, a qual possui poros de tamanho suficiente para permitir a difusão do substrato em direção às células, assim como dos produtos gerados pelo metabolismo celular para fora da matriz (JIANLONG; YI, 1999). A técnica de encapsulamento, portanto, foi escolhida neste trabalho para os experimentos de imobilização celular.

3.4.1. Imobilização Celular em Quitosana

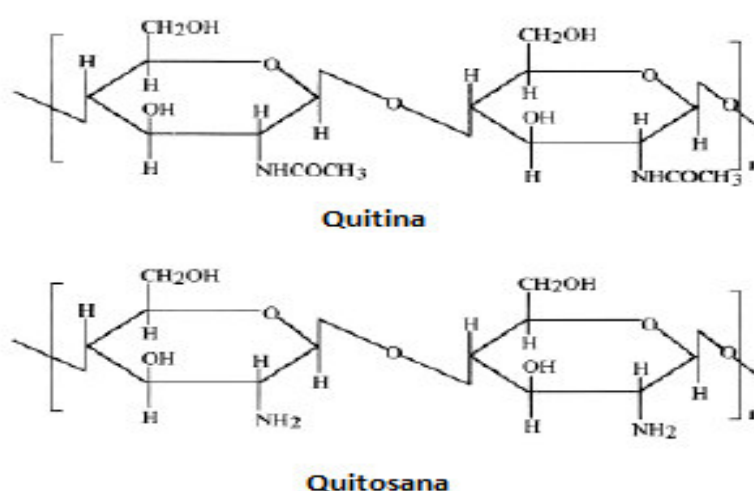
Vários polímeros naturais e sintéticos estão disponíveis para imobilização de enzimas e células. Polissacarídeos de algas como ágar, agarose, alginatos e carragenanas são classificados como polímeros naturais, enquanto poliacrilamida, poliestireno, poliuretano e alumina, como polímeros sintéticos. A preferência pelo uso de polissacarídeos naturais reside no fato deles serem abundantes na natureza,

economicamente viáveis e apresentarem baixa toxicidade, quando comparados aos de origem sintética (JIALONG *et al.*, 1999; DIAS; REZENDE; LINARDI, 2000; CRINI, 2005).

Entre os polímeros naturais, a quitosana é conhecida pela sua resistência mecânica, biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades não-tóxicas. Além disso, pode ser utilizada à temperatura ambiente (KRAJEWSKA, 2004; KURITA, 2006; COSTA *et al.*, 2014).

A quitosana é um co-polímero linear de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, obtido comercialmente através da desacetilação de quitina, a qual é encontrada no exoesqueleto de crustáceos (Figura 10). Em comparação com quitina, que é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, a quitosana é solúvel em ácidos orgânicos diluídos, tais como ácido acético e ácido fórmico, e coagula em meio alcalino (GUIBAL, 2005). Esta propriedade é explorada em sistemas controlados por coagulação podendo produzir diferentes formas, tais como esferas, filmes e membranas para distintas aplicações. A imobilização em esferas apresenta algumas vantagens quando comparada a células somente adsorvidas em matrizes, como o fato de proteger os microrganismos contra os efeitos tóxicos dos compostos poluentes que possam estar no meio, facilitar a manipulação celular e diminuir a competição com a microbiota local (KRAJEWSKA, 2004; CARVALHO, 2006).

Figura 10. Estrutura molecular da quitina e da quitosana (Azevedo *et al.*, 2007).



A preparação de microesferas é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que as microesferas possuem uma área superficial cerca

de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos. Além disso, as microesferas apresentam cinéticas de adsorção mais rápidas e maior facilidade de manuseio e operação (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A literatura relata estudos envolvendo a quitosana como suporte para imobilização de micro-organismos. Angelim *et al.* (2013) desenvolveram uma estratégia de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo contendo consórcio de bactérias imobilizadas em esferas de quitosana. Rocha *et al.* (2012) imobilizaram o fungo *P. citrinum* em quitosana para avaliar a redução de cetonas. Estudo realizado por Costa *et al.* (2014) apresentou a imobilização de *B. pumillus* em esfera de quitosana que permitiu a degradação de 90,8% de hexadecano.

Visto isso, a utilização da quitosana para a imobilização mostra-se bastante promissora, visando sua possível aplicação na remoção de contaminantes ambientais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta da turfa

No dia 2 de Abril de 2013, aproximadamente um total de 1 kg de turfa foi coletado na turfeira do município de Santo Amaro das Brotas no Estado de Sergipe, Brasil.

Foram escolhidos 4 pontos de coleta, sendo um ponto principal (N 07° 20.729' / W 88° 35.113') e outros três equidistantes a 3 metros do ponto central, sendo o solo coletado a uma profundidade de 5-20 cm. Em seguida, as amostras foram misturadas e homogeneizadas, utilizando frasco de vidro e espátula estéreis, formando uma amostra composta. Esta foi trazida ao laboratório e armazenada a 4°C.

Parte da amostra foi levada ao Instituto Tecnológico e de Pesquisa do Estado de Sergipe (ITPS), onde foram realizadas as análises físico-químicas, como pH, CTC, Magnésio, Alumínio, Sódio, Potássio, Cobre, Manganês, Zinco e matéria orgânica, de acordo com o protocolo da Embrapa (1997), a fim de obter os parâmetros de condições abióticas.

4.2. Isolamento dos Micro-organismos

Esta parte experimental de isolamento foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada, do Departamento de Morfologia, da Universidade Federal de Sergipe, sob supervisão do prof. Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior.

É importante salientar que os procedimentos com os micro-organismos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança estipuladas para este tipo de trabalho, utilizando para isto uma capela de fluxo laminar (modelo FUH09, Veco®) e esterilização dos materiais em autoclave (modelo Q190, Quimis®).

Os micro-organismos foram isolados de acordo com Madueño *et al.* (2011) com algumas modificações. Inicialmente uma porção do solo (1g) foi diluído em 9 mL de meio mineral (MM1) estéril [composição in g/L: KCl, 0,7; KH₂PO₄, 2,0; Na₂HPO₄, 3,0; NH₄NO₃, 1,0]; solução de micronutrientes, 1 mL/L (composição em g/L MgSO₄, 4,0; FeSO₄, 0,2; MnCl₂, 0,2; CaCl₂, 0,2)] e deixado em agitação por 30 minutos. Após isso, 1 mL desta solução foi inoculado em 9 mL de meio mineral contendo o fluoranteno como única fonte de carbono, nas concentrações de 5 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹, respectivamente. Foram realizadas três diluições sucessivas (10⁻¹ a 10⁻³) para cada concentração. Além disso, também foi feito um controle negativo nas mesmas condições acima, com a exceção de que o meio mineral não foi enriquecido com hidrocarboneto.

As amostras foram deixadas sob agitação orbital a 150 rpm à temperatura ambiente por 7 dias. Após isso, inóculos de 100 µL de cada condição foram semeados, utilizando a técnica de espalhamento, com o auxílio de alça Drigalsky, em placas de petri contendo Ágar Nutriente e Ágar Sabouroud em duplicata. As placas foram mantidas em incubação durante 48h a 30° C até a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

4.2.1. Caracterização Fenotípica

Os micro-organismos que cresceram nas condições apresentadas no tópico 4.2 foram transferidos individualmente para novas placas contendo Ágar Nutriente ou Sabouroud (a depender de qual meio cresceram inicialmente) e caracterizados quanto ao tamanho (maior ou menor que 1 mm); forma (puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme); elevação (plana, elevada, convexa, pulviniforme, umbonada); bordos (inteiro, ondulado, lobado, denteado-irregular, filamentoso, encrespado); detalhes ópticos (transparente, opaca, translúcida, brilhante), cor (pigmentado ou sem pigmentação) e superfície (lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta). Estes parâmetros de caracterização seguem protocolo padrão utilizado no referido laboratório.

Após essa caracterização macroscópica, foi realizada a caracterização microscópica através da coloração de Gram para as bactérias. A coloração consistiu em fazer um esfregaço do micro-organismo bem fino e homogêneo em uma lâmina, o qual foi coberto com cristal violeta por 1 minuto. Após isso o cristal foi escorrido utilizando-se água destilada e deixado por mais 1 minuto. O esfregaço foi coberto com lugol por 1 minuto e depois descorado com álcool etílico e deixado por 1 minuto. A lâmina foi lavada cuidadosamente com água destilada e a preparação foi coberta com fucsina básica por 30 segundos. Novamente a lâmina foi lavada com água destilada e seca. Após isso, a lâmina foi examinada em microscópio com objetiva de imersão e visualizada a coloração e forma dos micro-organismos. As bactérias Gram + coram-se em violeta e Gram –, em rosa.

4.2.2. Identificação Molecular dos Micro-organismos Isolados

Os procedimentos relativos à extração de DNA, PCR e purificação dos produtos de PCR foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, sob a orientação do Prof. Leandro Eugenio Cardamone Diniz.

Para o sequenciamento dos produtos de PCR, estes foram enviados para o Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, o qual utiliza o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems®), um sistema de análise de DNA de 48 capilares. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas ocorrerem em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

4.2.2.1. Bactérias: Extração de DNA e PCR

O DNA das bactérias foi extraído seguindo o protocolo proposto por Chen e Kuo (1993), com modificações. Primeiramente, foi realizado repique das bactérias em caldo nutriente e deixado sob agitação orbital a 150 rpm, overnight. Após isso, 2 mL de cultura foram transferidos para tubos de micro centrífuga e centrifugados a 4.300 rpm a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 200 µL de tampão GTE gelado, o qual é composto por 50 mM de Glucose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0 e 0,1 mg/mL de RNase.

Logo após, foram adicionados 400 µL de solução de NaOH (0,2N) + 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e os tubos foram invertidos por algumas vezes para

homogeneizar a mistura. Estes tubos foram então incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, prosseguiu-se com a adição de 300 µL de Acetato de Potássio e novamente os tubos foram invertidos. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Foram então transferidos 750 µL do sobrenadante para outro tubo de micro-centrifuga e o que continha o pellet foi descartado. Foram adicionados 450 µL de Isopropanol gelado a esse sobrenadante retirado da etapa anterior e foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C, a fim de se obter um novo pellet.

Após esta etapa, todo o sobrenadante obtido foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se novamente por 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Este processo de lavagem foi repetido por uma segunda vez, porém adicionando-se 500 µL de etanol 70% gelado. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi deixado secar em temperatura ambiente até que se tornasse transparente. Ao final, 40 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) foram adicionados aos tubos que continham os pellets e o DNA foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Modelo 2000, Thermo Scientific®).

Uma alíquota do DNA extraído foi amplificado por PCR para o gene 16S através dos primers 968F (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e 1401 R (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') (SIMENC; POTONIK, 2011) os quais geram um amplicom de aproximadamente 450 bp. A reação de amplificação foi feita em um volume final de 50 µL, sendo: 50ng de DNA, Tampão 1X; 3 mM de MgCl₂; 25uM de cada dNTP; 0,4µM de cada primer; 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 5% de Dimetilsufóxido (DMSO) e H₂O deionizada estéril para completar o volume. A reação foi realizada em termociclador Veriti® 96 Well (Applied Biosystems®). A reação foi realizada em termociclador Veriti® 96 Well (Applied Biosystems®). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: Uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguindo de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 56°C por 40 segundos e polimerização a 72°C por 40 segundos, seguindo uma extensão final a 72°C por 3 minutos. Os produtos do PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose (1%) e corado com brometo de etídio.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit” da GE Healthcare, em que foram seguidos os passos do protocolo. Logo após, as amostras foram enviadas para o sequenciamento no Centro de Genoma Humano da USP.

4.2.2.2. Fungos: Extração de DNA e PCR

Para a extração do DNA foi utilizado o kit Nucleo Spin Plant II Macherey-Nagel e seguido todo o seu protocolo. Ao final, o DNA extraído foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Modelo 2000c, Thermo Scientific®).

Uma alíquota do DNA extraído foi amplificado por PCR para o gene 18S através dos primers ITS1 F (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCC G 3') e ITS 4 R (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (JACQUES *et al.*, 2009), os quais geram um amplicom de aproximadamente 645 bp. A reação de amplificação foi feita em um volume final de 50 µL, sendo: 50ng de DNA, Tampão 1X; 3 mM de MgCl₂; 12,5µM de cada dNTP; 0,4µM de cada primer; 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e H₂O deionizada estéril para completar o volume. A reação foi realizada em termociclador Veriti® 96 Well (Applied Biosystems®). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: Uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguindo de 40 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e polimerização a 72°C por 1 minuto, seguindo uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos do PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose (1%) e corado com brometo de etídio.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean Up System” da Promega, em que foram seguidos os passos do protocolo. Logo após, as amostras foram enviadas para o sequenciamento no Centro de Genoma Humano da USP.

4.2.2.3. Análise das sequências obtidas e construção de árvore filogenética

Os eletroferogramas obtidos através do sequenciamento foram primeiramente analisados utilizando-se o programa Chromas Lite® 2.1.1 (<http://technelysium.com.au>), onde foram realizadas as correções necessárias nas sequências para possibilitar a análise de similaridades utilizando-se o BLASTn/NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Após este primeiro screening inicial feito para todos os micro-organismos isolados, foi realizada uma análise mais refinada utilizando-se o programa Geneious® v. 6.1.8 (<http://www.geneious.com> - KEARSE *et al.*, 2012) para as sequências referentes à micro-organismos selecionados nos ensaios de biodegradação que se destacaram por sua melhor eficiência neste processo. Ademais, para estas referidas sequências foi construída uma árvore filogenética usando o método Neighbor-Joining com o programa Mega V 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) utilizando os parâmetros de

distância p , com método de bootstrap de 1000 replicações e deleções completas. Estas sequências foram depositadas no Genbank (Anexo A).

4.3. Estocagem dos Micro-organismos

Para manter as culturas viáveis de utilização por um longo prazo, métodos de estocagem foram estabelecidos de acordo com os procedimentos já utilizados pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada (UFS).

Para as bactérias, foi realizada a criopreservação a -80°C . Para isso foi seguido o seguinte protocolo: Cada linhagem isolada foi repicada em 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) esterilizado, respectivamente. Estas amostras foram incubadas a 35°C por 24h. Após isso, 0,3 mL de glicerol estéril foram adicionados a criotubos e então 1,2 mL do caldo bacteriano referente a cada cepa transferido para estes criotubos com glicerol. Os criotubos foram invertidos algumas vezes para homogeneizar as amostras. O procedimento foi feito em duplicata para cada bactéria isolada. Os criotubos foram então estocados em freezer -20°C por 24 h e depois transferidos para ultrafreezer com temperatura de -80°C .

Para os fungos foi realizada a preservação em água destilada (método de Castellani), no qual 5 mL de água deionizada foram adicionados a frascos de penicilina e autoclavado. Após isso, pequenos blocos do fungo crescido em Ágar Sabouroud foram adicionados aos frascos respectivos com auxílio de pinças estéreis. Estes foram estocados a temperatura ambiente, protegidos da luz.

4.4. Ensaio de Biodegradação do Fluoranteno

Estes procedimentos foram inicialmente realizados no Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise, do Instituto de Química da USP, sob supervisão do prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto.

Para os ensaios de biodegradação do fluoranteno, foram realizados procedimentos metodológicos diferentes para as bactérias e fungos.

4.4.1. Ensaio de Biodegradação com Bactéria

Este procedimento foi realizado de acordo com Kumar *et al.* (2011) com modificações. Inicialmente, as bactérias selecionadas para os testes de biodegradação foram inoculadas em ágar nutriente suplementado com 100 mg L^{-1} de fluoranteno (padrão analítico Sigma, 98% de pureza) e incubadas por 24 h a 32°C . Após isto, foi

realizada uma suspensão dessas células crescidas utilizando NaCl 0,85% para obtenção de uma densidade ótica de 0,1 a 610 nm, medido com espectrofotômetro UV-Vis (modelo Genesis 10s, Thermo Scientific®). Esse valor é referente à concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (escala 0,5 de Mc Farland).

Dessa forma, 200 µL dessa suspensão da linhagem bacteriana foi então transferida para 10 mL de meio nutriente líquido (NB), contendo 100 mg L⁻¹ fluoranteno. O experimento foi feito em triplicata e as amostras foram incubadas em agitação orbital, 150 rpm, 32 °C, por um período de 5 e 10 dias, respectivamente, para avaliação da biodegradação.

Além disso, também foram realizados dois controles: o controle abiótico, em que foi adicionado o fluoranteno ao meio líquido nas mesmas condições acima sem a adição da bactéria para verificação da degradação do HPA por fatores abióticos; e o controle bacteriano, em que não foi adicionado o fluoranteno no meio para que pudesse ser observada a diferenciação dos metabólitos naturais produzidos pela bactéria e os induzidos pela presença do fluoranteno.

Com o intuito de avaliar o crescimento das bactérias durante o período de degradação, alíquotas do meio de cultura (triplicata) foram diariamente retiradas para medir a densidade celular pelo espectrofotômetro UV- VIS a 610 nm.

Após o período de degradação estipulado, foi realizada a extração do fluoranteno residual utilizando o acetato de etila como solvente extrator. Primeiramente, 10 mL deste solvente foram adicionados a cultura bacteriana e deixado em agitador magnético por 30 min. Após isto, esta mistura foi então centrifugada a 5000 rpm por 15 min e o sobrenadante coletado em um béquer e ajustado o pH para 7. Esse sobrenadante foi extraído por mais 2x com 10 mL de acetato de etila, utilizando agora um funil de separação. A fase orgânica foi coletada e adicionada sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), a qual posteriormente foi filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 100 mL para rotaevaporação do excesso do solvente. O resíduo foi transferido para balão volumétrico de 1 mL e seguiu-se com a análise cromatográfica.

4.4. 2. Ensaio de Biodegradação com Fungo

A verificação do crescimento fúngico em meio contendo fluoranteno, assim como a avaliação da biodegradação foram realizados de acordo com Alvarenga *et al.* (2014), com algumas modificações.

Os fungos a serem avaliados na biodegradação foram inicialmente inoculados em ágar malte 2% suplementado com 100 mg L^{-1} fluoranteno e deixados em incubação por 7 dias a 32°C . Após isto, 7 fatias circulares com 5 mm de diâmetro foram retiradas das placas fúngicas e adicionadas ao meio líquido malte 2%, onde ficaram em agitação orbital a 130 rpm, 32°C por 5 dias. Após esta fase inicial de adaptação, foi adicionado fluoranteno (100 mg L^{-1}) ao meio de cultura. As amostras foram deixadas por um período de 14 e 28 dias, respectivamente, nas mesmas condições de agitação e temperatura para avaliação da biodegradação. Além disso, também foram realizados o controle abiótico e fúngico, de acordo com o item 6.1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após os respectivos períodos de reação, as culturas foram filtradas utilizando-se papel filtro em um aparato de filtração Buchner acoplado a um kitassato de 250 mL. Após a separação, o caldo enzimático ficou reservado separadamente e o micélio úmido retido ao filtro foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de água destilada e 30 mL de acetato de etila e submetido à agitação magnética por 30 minutos para a lise das células fúngicas. Em seguida, as células foram novamente filtradas em filtro Buchner, o extrato foi adicionado ao caldo enzimático previamente recolhido e o pH da solução ajustado para 7. A massa fúngica foi lavada com acetato de etila (30 mL) e posteriormente seca a 32°C durante 7 dias para a determinação da massa fúngica seca. O extrato final foi extraído por partição líquido-líquido com acetato de etila em 3 etapas de 30 mL com funil de separação. À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), a qual posteriormente foi filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL para rotaevaporação do excesso do solvente. O resíduo foi transferido para balão volumétrico de 5 mL e seguiu-se com as análises cromatográficas.

4.5. Análise Cromatográfica

Os extratos obtidos após a etapa de extração foram analisados utilizando-se o cromatógrafo a gás (Shimadzu GC2010 com auto injetor AOC 20i) equipado com detector de ionização por chama (GC-FID). A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi a DB5 (5% fenil-95% polidimetilsiloxano) com 30 m de comprimento, diâmetro externo de 0,25 mm e espessura do filme $0,25 \mu\text{m}$ (J&W Scientific®). As condições operacionais foram as seguintes: Programação do forno 100°C por 1 minuto, seguindo uma rampa de aquecimento de 8°C min^{-1} até atingir a

temperatura de 280°C que foi mantida por 7,5 minutos. O modo split de injeção (1:20) foi utilizado e a temperatura do injetor foi de 250 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL min⁻¹. A quantificação de degradação do fluoranteno foi realizada pelo método do padrão interno com o Antraceno (99% de pureza, Vetec®).

Para a análise dos metabólitos gerados durante a biodegradação, os extratos foram submetidos a análise com um cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) (Shimadzu GC MS2010 plus) com modo de ionização eletrônica (EI, 70 eV). As especificações da coluna foram as mesmas da utilizada no GC-FID. A temperatura do forno foi de 90°C por 2 minutos, seguido de um rampa de aquecimento de 6 °C min⁻¹ até atingir a temperatura de 280°C, a qual foi mantida por 6,33 minutos. O hélio foi utilizado como gás de arraste com razão de fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O modo split de injeção (1:5) foi utilizado e a temperatura do injetor foi de 250 °C. A identificação dos metabólitos foi realizada de acordo com as bibliotecas Nist 05, 05s, 21, 107 e Wiley 8, e confirmada pela similaridade do padrão de fragmentação dos compostos.

4.6. Imobilização em Quitosana

Os ensaios referentes à imobilização dos micro-organismos em quitosana foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Costa *et al.* (2014) com algumas modificações.

4.6.1. Avaliação do Efeito da Quitosana Sobre a Linhagem Seleccionada

O efeito da solução de quitosana sobre as bactérias selecionadas foi realizado com o intuito de verificar uma possível toxicidade desta solução sobre os micro-organismos. Para isso, inicialmente as respectivas culturas bacterianas foram crescidas no meio NB a 32°C por 18h. Então, 100 µL dessas culturas foram transferidos para tubos contendo 1 mL de solução de quitosana nas concentrações de 1, 2, 3 e 4%, previamente preparados em 1% de ácido acético. Além disso, também foi usado 1 mL de meio NB (controle negativo) e 1 mL de 1% de ácido acético (controle da solução de quitosana). Ao final de 1h e 24h foram realizados subcultivos em placas de Petri contendo meio ágar nutriente, e após a incubação a 35°C por 24h, essas placas foram analisadas visualmente para verificar o efeito da quitosana sobre o crescimento das bactérias.

4.6.2. Pesquisa da Atividade Quitosanásica

A pesquisa da quitosanase foi realizada inoculando-se as linhagens bacterianas em ágar quitosana-mineral e confirmada pela verificação de halos de hidrólise ao redor das colônias após a incubação a 32°C por 24h. Para este ensaio as linhagens de bactérias foram previamente crescidas em meio líquido NB por 24h e então tiveram sua densidade ótica ajustada para 0,1 com o auxílio do espectrofotômetro UV-VIS a 600 nm. Logo depois, 15 µL das respectivas culturas foram gotejadas em placa de ágar quitosana a 1% preparado com solução de sais minerais, como descrito por Costa *et al.* (2014).

4.6.3. Preparação das Esferas de Quitosana Imobilizada com a Linhagem Seleccionada

A cultura bacteriana que melhor se desenvolveu nos ensaios dos itens acima, foi crescida em meio líquido NB a 32°C, 150 rpm, por 18h. Após isso, sua absorvância foi ajustada a $1,00 \pm 0,02$ em espectrofotômetro UV-VIS a 600 nm. Essa cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em solução de NaCl 0,9% de maneira asséptica, de acordo com a seguinte proporção: cada 30 mL de meio centrifugado foram ressuspensos em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% esterelizada. Essa suspensão foi transferida para uma solução de quitosana a 4%, previamente dissolvida em 1% de ácido acético e autoclavada a 110 °C por 10 min.

Essa suspensão de células em quitosana foi homogeneizada durante 10 minutos com o auxílio de um bastão de vidro, e em seguida foi mantida em repouso por 10 minutos. Então, esta solução foi transferida para uma bureta estéril, sendo em seguida gotejada em uma solução de Tripolifosfato de sódio 1% (pH 9) para a coagulação e formação das esferas. As esferas permaneceram nessa solução por 40 min, em agitação magnética, a fim de aumentar a sua consistência. Em seguida, as esferas foram lavadas com 200 mL de solução de NaCl 0,9% esterelizada, permanecendo por 10 min. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais 2 vezes. A preparação das esferas foi realizada sob condições assépticas em capela de fluxo laminar. Após estas lavagens, as esferas foram utilizadas nos ensaios de biodegradação do fluoranteno.

As esferas foram estocadas assepticamente em solução de NaCl 0,9% sob refrigeração a 4°C para posterior análise de espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.6.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR das amostras da bactéria *Serratia* sp. Ac-11, das esferas de quitosana pura e das esferas de quitosana imobilizada com a bactéria foram obtidos utilizando pastilhas de KBr (1:100 amostra/KBr) em um espectrômetro de infravermelho da marca Varian, modelo 640 IR, no Laboratório de Síntese e Aplicação de Materiais (LSAM), do Departamento de Química, na Universidade Federal de Sergipe. As amostras foram previamente secas e o espectro foi varrido de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , aquisição de 32 *scans* por amostra, empregando o espectro do ar como *background*.

4.6.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias das amostras de quitosana e quitosana imobilizada com a bactéria foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Instrumentação I, do Programa de Pós Graduação em Química, no Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe, e obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura da marca Hitach, modelo TM 3000, operando com voltagem de aceleração de 15 kV e corrente de filamento de 1850 mA, sob alto vácuo.

4.6.6. Ensaio de Biodegradação com Célula Imobilizada

Os ensaios de biodegradação com a bactéria imobilizada em esferas de quitosana foram realizados seguindo os mesmos parâmetros dos ensaios com a célula livre, com algumas modificações. Dois gramas das esferas imobilizadas foram incubadas em um erlenmeyer contendo 20 mL de meio líquido (NB) suplementado com 100 mg L^{-1} de fluoranteno. As amostras foram deixadas em agitação orbital 140 rpm, 32 °C, por 5 e 10 dias, respectivamente, para avaliação da biodegradação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o período de biodegradação estipulado, foi realizada a extração do fluoranteno residual. Inicialmente foi efetuada uma filtração utilizando-se papel filtro em um aparato de filtração Buchner acoplado a um kitassato de 250 mL para separação

das esferas e da fase líquida. As esferas retidas foram lavadas com acetato de etila (20 mL). A fase líquida foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4°C. Logo após, foi realizada a extração líquido-líquido por 2x com 20 mL de acetato de etila, utilizando um funil de separação. A fase orgânica foi coletada e adicionada sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), a qual posteriormente foi filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL para rotaevaporação do excesso do solvente. O resíduo foi transferido para balão volumétrico de 2 mL e seguiu-se com a análise cromatográfica, como descritas no item 7.

4.6.7. Teste para Reutilização das Esferas Imobilizadas

As esferas imobilizadas foram testadas em sua capacidade para a reutilização em ciclos contínuos. Para isso, foi seguido o mesmo procedimento do item 4.6.6, sendo que as esferas retidas na filtração após o período de incubação de 5 dias foram imediatamente coletadas com auxílio de uma espátula estéril e transferidas para um novo meio líquido contendo 100 mg L^{-1} de fluoranteno. Este procedimento de reuso foi realizado por 5 vezes consecutivas. A extração do fluoranteno residual foi feita de acordo com o item 8.6 para os extratos obtidos para cada ciclo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização Físico-Química da Turfa

A caracterização físico-química de turfa coletada está resumida na Tabela 4. A turfa é classificada como organossolo principalmente devido ao seu alto teor de matéria orgânica ($> 80 \text{ mg Kg}^{-1}$) e baixos valores de pH. A composição química da turfa é diretamente influenciada pela natureza do material orgânico, a taxa de decomposição da matéria orgânica, a porção mineral e a composição química da água de formação (EBELING *et al.*, 2011), fazendo com que cada turfeira possua propriedades particulares.

Tabela 4. Características físico-químicas da Turfa coletada em Santo Amaro das Brotas –SE.

Parâmetros	Resultados
pH	4,1
Matéria Orgânica	80,7 g.dm ⁻³
CTC	9,68 cmol _c .dm ⁻³
Ca ⁺²	0,95 cmol _c .dm ⁻³
Mg ⁺²	1,61 cmol _c .dm ⁻³
Al ⁺³	1,88 cmol _c .dm ⁻³
Na ⁺	42,9 mg.dm ⁻³
K ⁺	25,2 mg.dm ⁻³
P	3 mg.dm ⁻³
Fe ⁺²	19,17 mg.dm ⁻³
Cu ⁺²	0,09 mg.dm ⁻³
Mn ⁺²	2,77 mg.dm ⁻³
Zn ⁺²	1,54 mg.dm ⁻³

O valor de pH em água obtido no presente estudo está de acordo com Silva *et al.* (2009), o qual realizou estudo com turfa do Estado de Minas Gerais, mostrando que tem caráter ácido devido à presença de ácidos húmicos e fúlvicos.

As concentrações de Mg⁺² encontradas na amostra coletada foram maiores que Ca⁺², assim como a concentração de Na⁺ maior que a de K⁺ (Tabela 4). De acordo com Ebeling *et al.* (2011) esse efeito pode estar relacionado com a influência de sedimentos marinhos ou lagunares, proximidade de regiões costeiras, ou, ainda, pode fazer parte da composição do material de origem sedimentar de tempos pretéritos, características presentes na turfa de Santo Amaro das Brotas.

De acordo com Bragazza *et al.* (2007) turfeiras são tipicamente divididas em ombrotróficas, que são alimentados exclusivamente pela precipitação atmosférica e por esta razão têm baixa disponibilidade de nutrientes e minerotróficas, que recebem água e nutrientes a partir de precipitação, bem como das águas subterrâneas locais, e portanto possuem uma biodisponibilidade de nutrientes resultando em uma maior produtividade de biomassa. Dessa forma, as características encontradas para a turfa de Santo Amaro das Brotas assemelham-se com a descrição de turfas minerotróficas por apresentar níveis elevados de alguns micronutrientes (Mg⁺², Na⁺, K⁺, Fe⁺², Mn⁺² e Zn⁺²) (Tabela 4) e possuir influência das águas subterrâneas.

Estudo realizado por Andersen *et al.* (2013) mostrou que, por ser um solo rico em nutrientes, a turfa, é conhecida por conter numerosas populações microbianas com ampla diversidade metabólica influenciada por diferentes variáveis ambientais.

5.2. Isolamento e Identificação dos Micro-organismos da Turfa

Considerando futuras aplicações em processos de biorremediação de ambientes contaminados, é interessante selecionar micro-organismos com a capacidade de degradar determinados xenobióticos, como por exemplo, os hidrocarbonetos. Devido a isso, a busca por novas fontes de micro-organismos com potencial de biodegradação está crescendo em todo o mundo (CERQUEIRA *et al.*, 2012).

Neste estudo, a turfa mostrou ser uma fonte potencial de micro-organismos degradadores de HPAs. Usando o fluoranteno como única fonte de carbono e energia, foi possível isolar 8 bactérias e 4 fungos. Isso demonstrou que, apesar deste solo não ter nenhum histórico de contaminação por HPAs, os micro-organismos isolados mostraram a capacidade de crescer em meio contaminado com fluoranteno e usá-lo para sua sobrevivência.

A Tabela 5 resume as características morfológicas das bactérias isoladas. Além delas, aspectos fenotípicos, como os descritos no item 4.2.1, foram levados em consideração para o isolamento. Foi observada a predominância quase que total de bacilos Gram positivos, com exceção do isolado AC-11.

Tabela 5. Características morfológicas dos isolados bacterianos.

ISOLADO	FORMA	GRAM
AC-5	bacilo	positiva
AC-10	bacilo	positiva
AC-11	bacilo	negativa
AC-15	bacilo	positiva
AC-19	bacilo	positiva
AC-25	bacilo	positiva
AC-26	bacilo	positiva
AC-40	bacilo	positiva

Com relação aos fungos, dos quatro isolados, um deles apresentou contaminação, sendo excluído dos experimentos. Os três restantes foram nomeados como AC-1, AC-6 e AC-7, os quais apresentavam colorações e características macroscópicas bem distintas entre eles.

Após esta caracterização inicial, a identificação molecular dos micro-organismos foi realizada. Para isso, após a extração de DNA dos micro-organismos foi feita a amplificação do DNA na região do gene 16S rRNA para as bactérias e do 18S rRNA para os fungos. O perfil eletroforético foi analisado e verificado o tamanho das bandas formadas para confirmação de que a amplificação ocorreu de forma satisfatória (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Eletroforese dos fragmentos de 450 pares de bases relativos à PCR do gene 16S rRNA. **M:** Marcador Molecular 100bp (Norgen Biotek 11500); **1:** Isolado AC-5; **2:** Isolado AC-10; **3:** Isolado AC-11; **4:** Isolado AC-15; **5:** Isolado AC-19; **6:** Isolado AC-25; **7:** Isolado AC-28; **8:** Isolado AC-43; **C:** Controle Negativo.

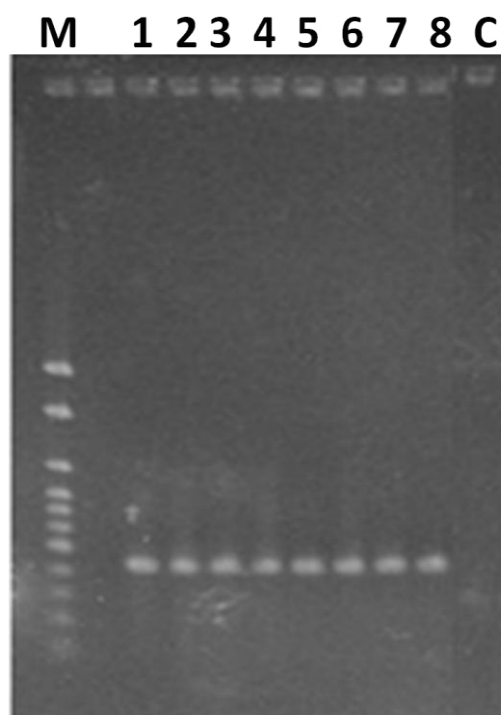
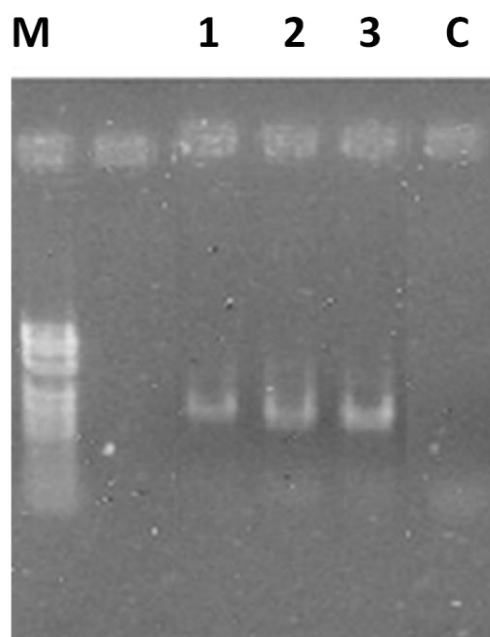


Figura 12. Eletroforese dos fragmentos de 645 pares de bases relativos à PCR do gene 18S rRNA. **M:** Marcador Molecular 100 bp (Norgen Biotek 11500); **1:** Isolado AC-1; **2:** Isolado AC-6; **3:** Isolado AC-7; **C:** Controle Negativo.



Os produtos de PCR foram purificados e enviados para o Centro de Genoma Humano na USP, onde foi realizado o seqüenciamento das amostras. Os eletroferogramas resultantes foram primeiramente analisados utilizando-se o programa Chromas Lite 2.1.1, em que foram realizadas as correções necessárias nas sequências para posterior análise no BLASTn. As respectivas homologias encontradas para os micro-organismos isolados estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6. Identificação molecular dos micro-organismos isolados da turfa utilizando o software BLASTn.

	ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	e-VALUE	SIMILARIDADE (%)
Bactérias	AC-5	<i>Bacillus sp.</i>	0	100
	AC-10	<i>Bacillus sp.</i>	0	99
	AC-11	<i>Serratia sp.</i>	0	99
	AC-15	<i>Lysinibacillus sp.</i>	0	99
	AC-19	<i>Bacillus sp.</i>	0	99
	AC-25	<i>Bacillus sp.</i>	0	99
	AC-26	<i>Brevibacillus sp.</i>	0	99
	AC-40	<i>Bacillus sp.</i>	0	99
Fungos	AC-1	<i>Penicillium sp.</i>	0	98
	AC-6	<i>Penicillium sp.</i>	0	99
	AC-7	<i>Fusarium sp.</i>	0	100

Os gêneros isolados e identificados neste trabalho possuem relatos na literatura a respeito do seu potencial de biodegradação de HPAs.

Estudos utilizaram cepas do gênero *Bacillus* na biodegradação de fluoranteno (KAFILZADEH *et al.*, 2013), naftaleno (LIN *et al.*, 2010) e fenantreno (DODDAMANI; NINNEKAR, 2000). A capacidade de *Serratia marcescens* em degradar quase 40% do benzo[a]pireno foi demonstrada por Machin-Ramirez *et al.* (2010). O estudo realizado por Reddy *et al.* (2010) mostrou a capacidade de *Brevibacillus sp.* em degradar 93% do fenantreno.

Em relação aos fungos, estudos com *Fusarium sp.* demonstraram a sua capacidade em degradar compostos orgânicos de alta massa molecular, tais como celulose de carvão, xilana, pectina, hidrocarbonetos (KANG e BUCHENAUER, 2000), bem como HPAs (CHULALAKSANANUKUL *et al.*, 2006, WU *et al.*, 2010).

O trabalho de Saraswathy e Hallberg (2002) mostrou a capacidade do *Penicillium sp.* em metabolizar o pireno como a única fonte de carbono e energia. Além disso, Leitão (2009) observou a potencialidade de diferentes cepas deste fungo em degradar compostos xenobióticos com baixos requisitos de co-substrato, sendo interessante para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a transformação de poluentes.

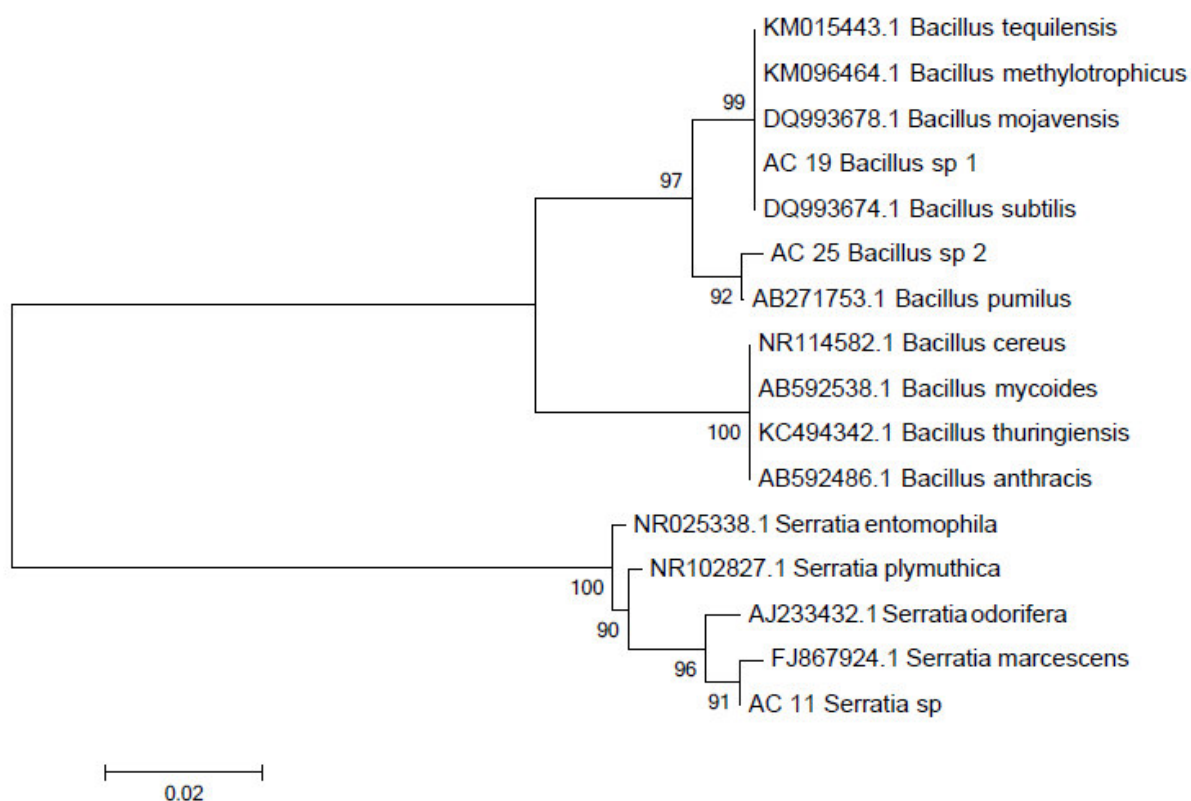
Sabe-se que o isolamento de micro-organismos degradadores de HPAs é muito mais relatado em solos com histórico de contaminação por hidrocarbonetos, devido à

adaptação metabólica e, conseqüentemente, a tolerância aos xenobióticos que eles apresentam. No entanto, solos pouco explorados e ricos em nutrientes, como é o caso da turfa, podem ser uma fonte de micro-organismos com potencial biotecnológico, inclusive de biodegradação de xenobióticos.

Com a impossibilidade de se trabalhar com todas as bactérias isoladas devido principalmente ao tempo necessário para a pesquisa, assim como outras limitações, 3 bactérias que melhor degradaram o fluoranteno foram selecionadas (isolados AC-11, AC-19, AC-25), como poderá ser observado no item 5.4. Com o intuito de uma melhor identificação molecular desses micro-organismos selecionados, foi realizada uma análise mais refinada dessas sequências utilizando-se o programa Geneious v. 6.1.8, como também como uma análise filogenética utilizando-se árvore Neighbor-Joining obtida pelo programa Mega V 6.0 usando os parâmetros de distância *p* com método de bootstrap de 1000 replicações e deleções completas.

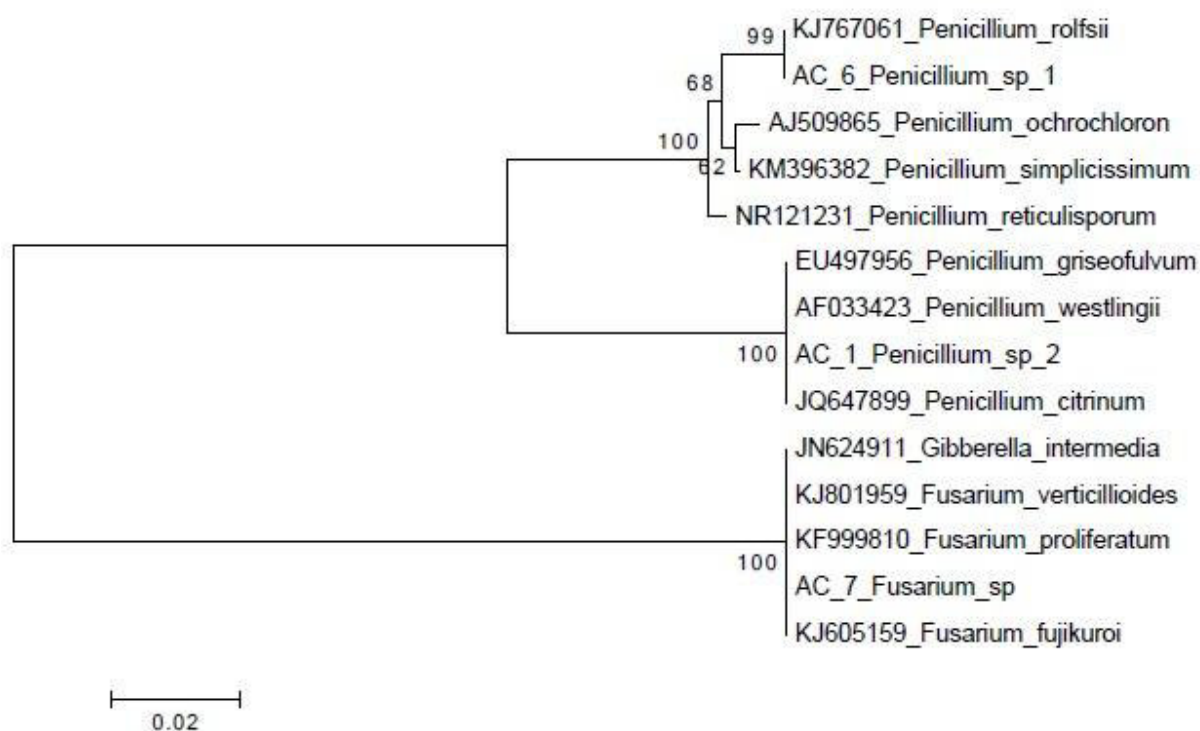
De acordo com a árvore obtida para as bactérias (Figura 13), foi possível observar a formação de dois clados. O isolado AC-19 (número de depósito no Genbank KP264564) e AC-25 (KP264563) estão localizados no clado pertencente ao gênero *Bacillus*, entretanto separados em 2 grupos distintos bem suportados. O isolado AC-11 (KP264565) está localizado no clado formado pelo gênero *Serratia*.

Figura 13. Árvore de agrupamento de Neighbor-Joining, construída com distância p e 1000 bootstrap, para sequência parcial do gene 16S das bactérias isoladas e outras sequências de bactérias encontradas no GenBank.



Com relação à árvore obtida para os fungos (Figura 14), dois clados também foram formados. O isolado AC-1 (KP264566) e AC-6 (KP264567) foram agrupados no clado formado pelo gênero *Penicillium*, entretanto separados por 2 grupos distintos bem suportados. O isolado AC-7 (KP264568) pertence ao clado formado pelo gênero *Fusarium*.

Figura 14. Árvore de agrupamento de Neighbor-Joining, construída com distância p e 1000 bootstrap, para sequência parcial do gene 18S dos fungos isolados e outras sequências de fungos encontradas no GenBank.



Os resultados obtidos pela construção das árvores filogenéticas de Neighbor-Joining confirmaram os resultados obtidos pela análise com o BLAST. O fato observado de dois isolados pertencerem ao mesmo clado, porém estarem em grupos diferentes, pode evidenciar que pertençam a espécies diferentes. Entretanto, isto não pode ser categoricamente afirmado devido as diversas limitações das sequências obtidas, como o tamanho do amplicom e o uso de apenas 1 gene, o que não permitiram com que a identificação chegasse ao nível de espécie.

Tanto as bactérias quanto os fungos selecionados para os testes de biodegradação estão representados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Figura 15. Isolados bacterianos selecionados: (A) *Bacillus* sp. AC-19; (B) *Serratia* sp. AC-11; (C) *Bacillus* sp. AC-25.

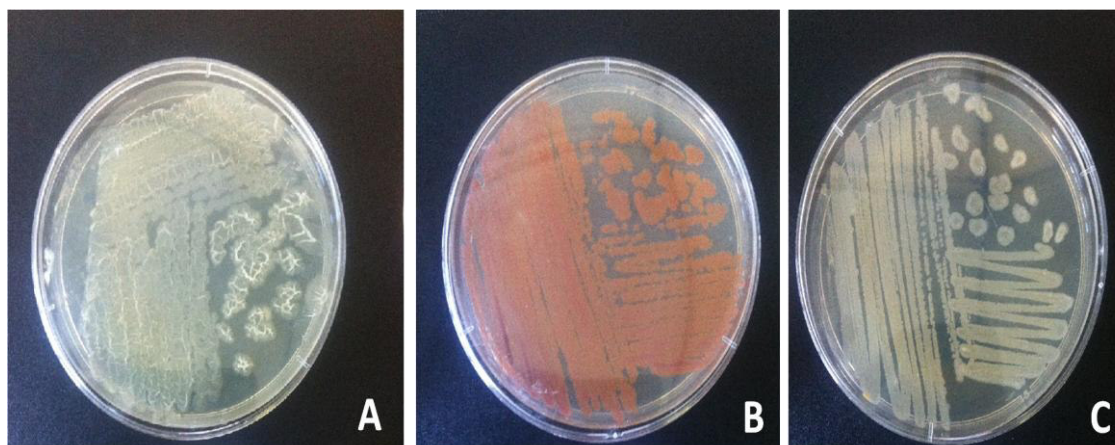
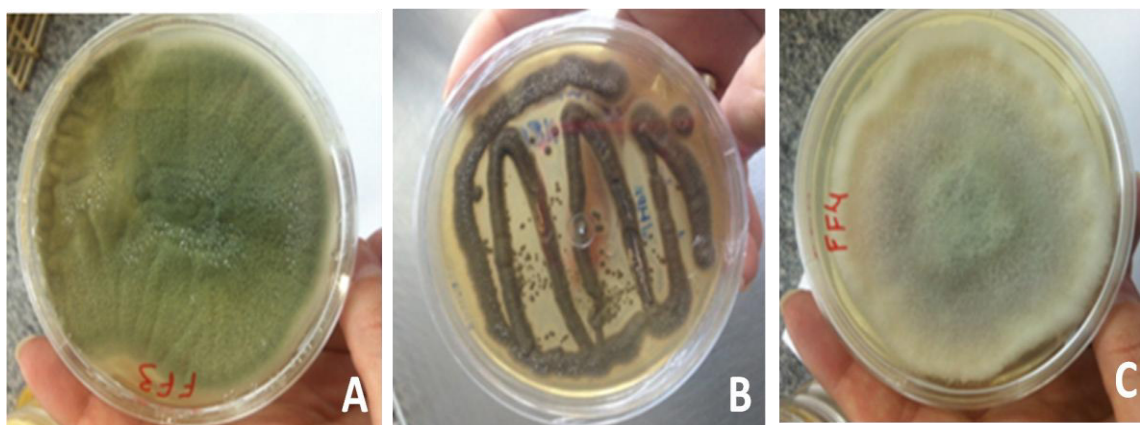


Figura 16. Isolados fúngicos selecionados: (A) *Penicillium* sp. AC-1; (B) *Penicillium* sp. AC-6; (C) *Fusarium* sp. AC-7.



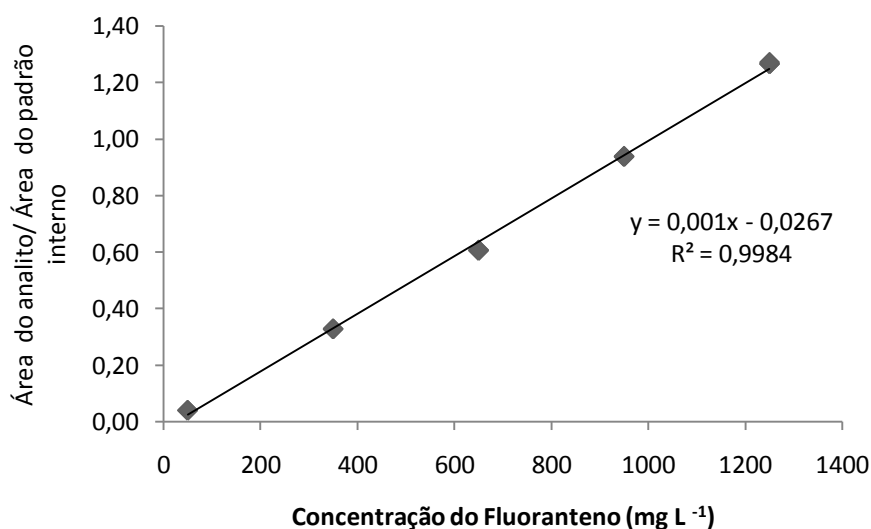
5.3. Análise Cromatográfica do Fluoranteno

A quantificação do fluoranteno foi realizada por GC-FID pelo método do padrão interno (antraceno), abrangendo um intervalo de concentração de 50, 350, 650, 950 e 1250 mg L⁻¹. Os pontos da curva analítica foram feitos em triplicata. Os valores das áreas estão representados na Tabela 7 e a linearidade da curva analítica pode ser observada na Figura 17.

Tabela 7. Valores da razão das áreas do Fluoranteno/ Padrão Interno para cada concentração da curva analítica.

Concentração (mg L ⁻¹)	Área do Fluoranteno/ Área do Padrão interno
50	0,0411 ± 0,0001
350	0,3289 ± 0,0008
650	0,6066 ± 0,0015
950	0,9378 ± 0,0011
1250	1,2668 ± 0,0034

Figura 17. Curva analítica e equação da reta para o fluoranteno.



Pela equação da reta obtida ($y = 0,001x - 0,0267$), foi possível calcular a concentração do fluoranteno residual nas amostras advindas do ensaio de biodegradação da seguinte forma:

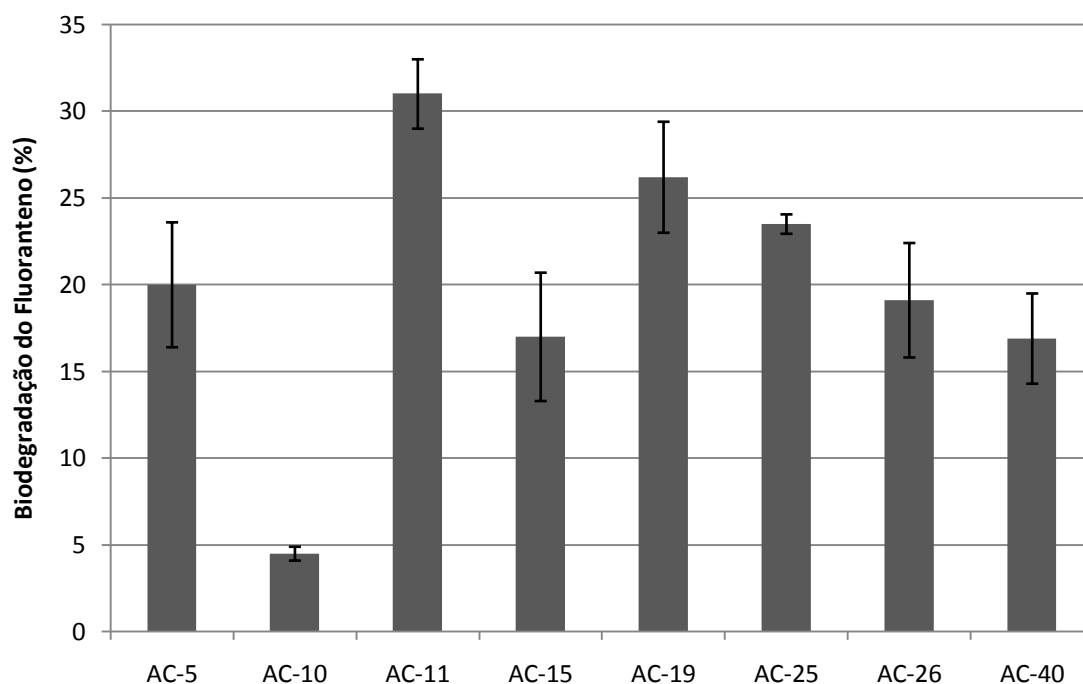
Concentração do Fluoranteno = [(área do analito/ área do padrão interno) + 0,0267 / 0,001].

5.4. Estudo da Biodegradação do Fluoranteno

Os ensaios de biodegradação com fluoranteno foram primeiramente realizados com as bactérias, já que possuíam um número maior de isolados para serem testadas.

Para isso, foi realizado experimento com cada uma delas e verificado a taxa de biodegradação após o período de 5 dias de incubação com o HPA. Os resultados encontram-se na Figura 18.

Figura 18. Gráfico da porcentagem de biodegradação do fluoranteno (100 mg L^{-1}) com as bactérias isoladas da turfa após período de incubação de 5 dias. Os valores são representados pela média e as barras de erro representam o desvio padrão amostral.

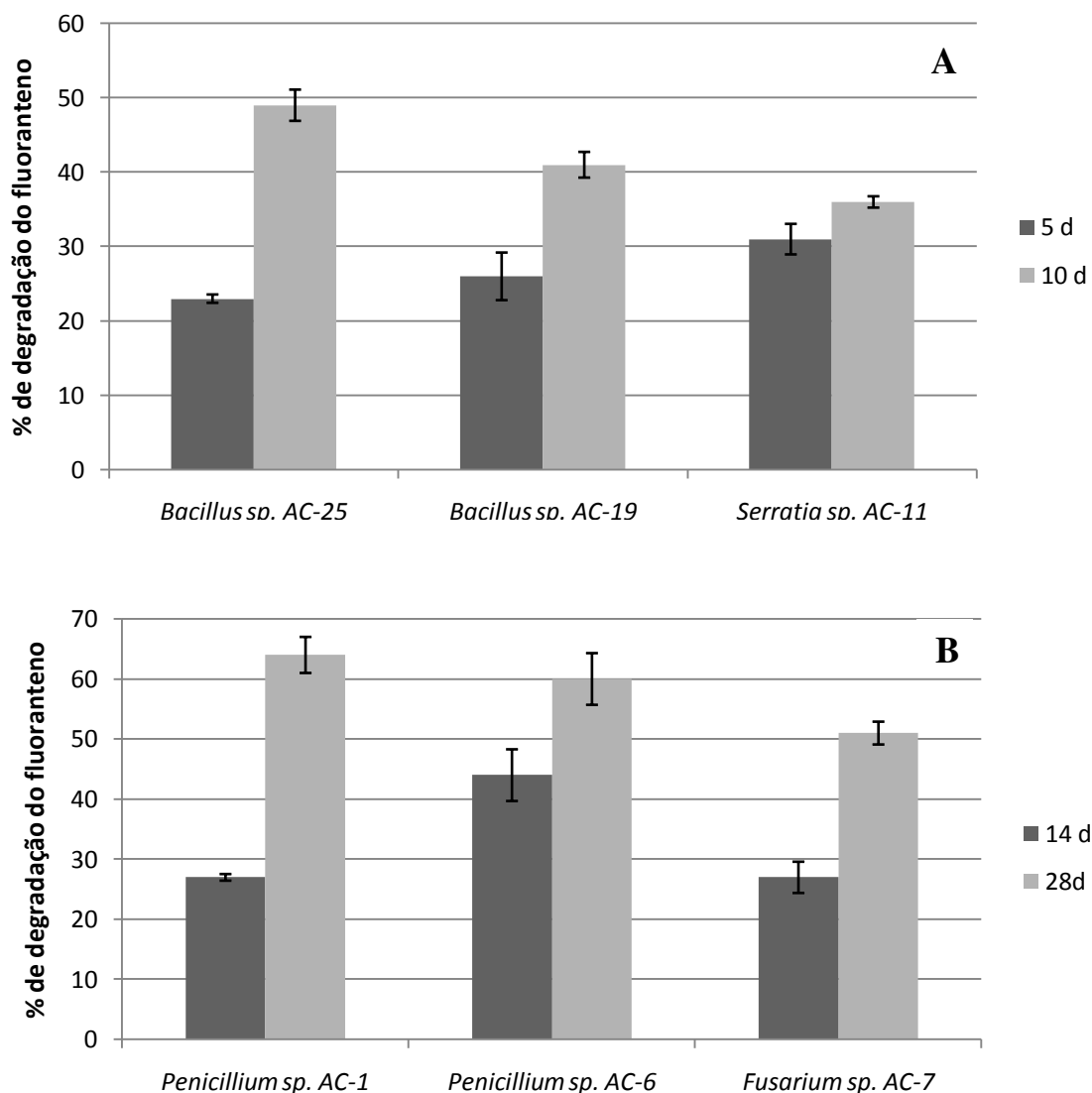


Foi observado que todas as cepas, durante o período de 5 dias, apresentaram capacidade de degradar o fluoranteno com taxa variando de 17% de degradação para AC-15 a 31% para a AC-11 (Figura 18), com exceção do isolado AC-10 em que esta taxa foi de apenas 4,5%, sendo este valor considerado desprezível.

Com base nestes resultados, foram selecionadas as três bactérias que apresentaram as melhores taxas de biodegradação, AC-11, AC-19 e AC-25, para dar continuidade aos experimentos. Com relação aos fungos, todos os três isolados foram testados com relação a sua capacidade de biodegradação.

Foram avaliados diferentes períodos de incubação em meio líquido contendo o fluoranteno (100 mg L^{-1}) tanto para as bactérias, 5 e 10 dias, quanto para os fungos, 14 e 28 dias. Os resultados da taxa de biodegradação encontram-se na Figura 19.

Figura 19. Porcentagem de degradação do fluoranteno para os diferentes períodos de incubação para as bactérias (A) e os fungos (B) isolados da turfa.



É possível observar diante dos resultados que para todos os micro-organismos testados, o maior período de incubação, 10 dias para as bactérias e 28 dias para os fungos, apresentou melhores taxas de biodegradação do fluoranteno. De acordo com Mishra *et al.* (2014) e Passarini *et al.* (2011), em geral, há um aumento significativo na taxa de degradação dos HPAs após períodos de incubação mais longos. Kumar *et al.* (2011) mostraram que a degradação de fluoranteno é inicialmente lenta devido a sua natureza hidrofóbica que limita a sua disponibilidade para os micro-organismos. No entanto, após a degradação inicial, uma polaridade é introduzida no fluoranteno provavelmente por enzimas extracelulares. Haritash e Kaushik (2009) relataram o envolvimento de oxigenases, desidrogenases e enzimas ligninolíticas, esta última no caso dos fungos. Enzimas ligninolíticas fúngicas são as ligninas peroxidases, lacases e

peroxidases dependente de manganês. Essas enzimas desestabilizam as ligações da molécula através da formação de radicais por oxidação.

No que diz respeito à biodegradação das bactérias, *Bacillus sp.* AC-25 obteve a maior taxa de biodegradação em 10 dias de incubação, degradando 49% do fluoranteno seguido por *Bacillus sp.* AC-19 (41%) e *Serratia sp.* AC-11 (36%). Resultados semelhantes foram demonstrados por Kumar *et al.* (2011) que isolaram quatro bactérias da lama do petróleo, denominadas de PSM6, PSM7, PSM10 e PSM11, as quais obtiveram uma taxa de biodegradação de 100 mg L⁻¹ do fluoranteno de 41%, 42%, 48% e 61%, respectivamente, após 7 dias de incubação. Estudo realizado por Xu *et al.* (2011) também relatou o isolamento de uma nova linhagem da bactéria *Herbaspirillum chlorophenolicum*, que foi capaz de degradar 58% do fluoranteno a 20 mg L⁻¹. Já o trabalho de Mishra *et al.* (2014) isolou 2 bactérias do lodo de petróleo, a *Pseudomonas aeruginosa* PSA5 e a *Rhodococcus sp.* NJ2, as quais foram capazes de degradar 74% do fluoranteno e 67%, respectivamente, em 10 dias e atingiram 97% de biodegradação quando em consórcio.

Com relação aos fungos testados, *Penicillium sp.* AC-1 foi capaz de degradar 64% do fluoranteno em 28 dias de incubação, enquanto *Penicillium sp.* AC-6 e *Fusarium sp.* AC-7 degradaram 60% e 51%, respectivamente. Foi observado que quantidades substanciais de depleção do fluoranteno (> 26%) foram alcançadas pelos fungos em 14 dias de incubação. Foi possível observar um aumento da taxa de degradação de 37% para *Penicillium sp.* AC-1, 24% para o *Fusarium sp.* AC-7 e 16% para *Penicillium sp.* AC-6, quando o período de incubação foi maior. Um estudo realizado por Passarini *et al.* (2011) sobre a biodegradação do benzo[a]pireno mostrou que *Aspergillus sclerotiorum*, *Mucor racemosus* e *Cladosporioides cladosporium* foram capazes de degradar 60,9%, 44,3% e 30,9%, respectivamente, em 8 dias de incubação, enquanto que em 16 dias estes fungos degradaram 70,6%, 51,7% e 45,3%, respectivamente.

Apesar de ter sido encontrado trabalhos utilizando esses gêneros isolados para uso na biodegradação de alguns HPAs, com relação especificamente ao fluoranteno, não se tem nenhum relato, até o momento, sendo este trabalho pioneiro em utilizar cepas isoladas de *Bacillus sp.* *Serratia sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* na biodegradação deste composto.

Além da análise da taxa de biodegradação pelos micro-organismos isolados da turfa nos diferentes períodos de incubação, foi monitorado também o seu crescimento durante o período de incubação com o fluoranteno.

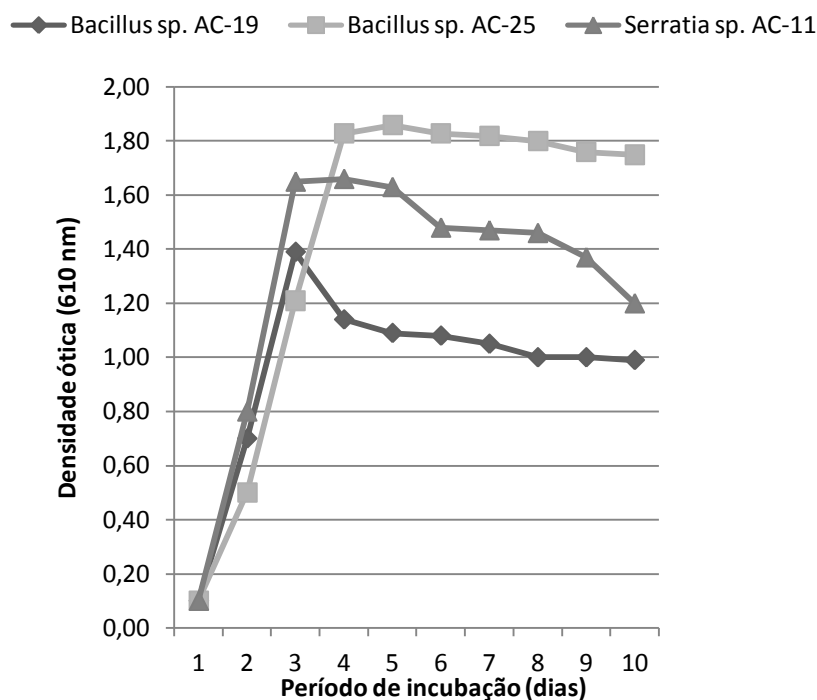
Para as bactérias, as densidades celulares foram medidas pela absorvância durante os 10 dias de incubação e estão representadas na Figura 20. Pode ser observado que para as três bactérias testadas não foi constatado uma fase de latência (fase lag), o que explica uma boa aclimação bacteriana a fonte de fluoranteno, o que ajudou a atingir a fase logarítmica muito rapidamente. Estudos realizados por Mishra *et al.* (2014) e Kafilzadeh *et al.* (2013) também mostraram esse crescimento rápido usando as suas linhagens bacterianas para degradar o fluoranteno.

Observa-se que os isolados *Bacillus* sp. AC-19 e *Serratia* sp. AC-11 tiveram um pico de densidade ótica em três dias e logo após um declínio, o que pode, provavelmente, estar ligado a morte celular. Como essas cepas conseguiram degradar taxas maiores de fluoranteno no período de 10 dias quando comparado a 5 dias (Figura 19), mesmo apresentando um declínio de crescimento, isto pode ser explicado por dois motivos propostos. O primeiro deles seria a absorção desse composto, metabolização do mesmo, seguido de morte celular devido à presença de toxicidade de algum metabólito produzido. Uma outra explicação possível seria pela saturação celular no meio, gerando acirrada competição por fonte de carbono e nutrientes, o que faria com que houvesse um decaimento da população bacteriana. É sugerido que estudos mais específicos sejam realizados para averiguar estas condições propostas.

De acordo com Kafilzadeh *et al.* (2013), cada cepa bacteriana possui um perfil de adaptação de crescimento diferente frente a estes compostos poluentes e que depende de muitos fatores, tais como a indução de enzimas específicas das vias de degradação ou a adaptação das enzimas catabólicas já existentes para degradar novos metabólitos gerados do composto original.

Com relação ao isolado *Bacillus* sp. AC-25, esse foi o que apresentou a curva de densidade ótica máxima para todos os dias investigados. Relacionando isso com seus respectivos resultados da taxa de biodegradação (Figura 19), pode-se inferir que o aumento na de aproximadamente 26% na taxa de biodegradação do período de 5 para 10 dias, pode ter sido influenciado por este alto e praticamente estável crescimento dessa bactéria, refletindo sua capacidade em degradar maiores taxas do fluoranteno em períodos mais longos.

Figura 20. Curva de crescimento dos isolados bacterianos durante o período de incubação com o fluoranteno.



Para os fungos, a análise do crescimento foi realizada através do peso da massa seca do micélio após o período de incubação (Tabela 8). A comparação entre a massa micelial obtida na reação de biodegradação e no controle fúngico (ausência de fluoranteno) mostraram uma diminuição no valor do peso quando comparado ao controle, o que indica uma inibição do crescimento celular ou a morte dos fungos causada pela presença do fluoranteno no meio. Resultados semelhantes foram encontrados por Alvarenga *et al.* (2014) que observaram uma inibição no crescimento de *Penicillium decaturense* e *Aspergillus sydowii* em relação ao controle quando expostos a biodegradação do pesticida parationa-metílico nos períodos de 10, 20 e 30 dias de incubação. De acordo com os autores, uma vez que os fungos degradaram o xenobiótico, eles podem ter absorvido este composto, promovendo uma biotransformação como um sistema de defesa, seguida de morte celular e conseqüente redução da massa seca do fungo.

Tabela 8. Peso seco dos micélios fúngicos (g) após os períodos de incubação.

Período de reação (dias)	<i>Penicillium sp. AC-1</i>		<i>Penicillium sp. AC-6</i>		<i>Fusarium sp. AC-7</i>	
	Controle	Biodegradação	Controle	Biodegradação	Controle	Biodegradação
14	0,65	0,62 ± 0,01	0,65	0,56 ± 0,04	0,61	0,52 ± 0,06
28	1,09	0,78 ± 0,12	0,88	0,68 ± 0,01	0,56	0,55 ± 0,05

Foi observada uma relação entre a quantidade de massa micelial dos respectivos fungos e a taxa de biodegradação para o período de 28 dias (Figura 19), mostrando haver uma influência proporcional direta da capacidade de crescimento e a taxa de biodegradação para períodos mais longos. Para o período menor de 14 dias isto não pôde ser comprovado, sugerindo nesse caso uma eficiência metabólica de cada fungo independente da taxa de crescimento.

Para assegurar que a degradação do fluoranteno não foi causada por uma redução na eficiência do processo de extração, foi realizado um teste de recuperação para avaliação da eficiência do método analítico de extração. Para tal, foi escolhida a concentração de 50 mg L⁻¹ (ponto médio de uma faixa de valores de 0 a 100 mg.L⁻¹, que corresponde aos valores de degradação que podem ser encontrados neste estudo) e foi obtido um valor de recuperação de 48 ± 1,9 mg.L⁻¹ (teste feito em triplicata), representando uma exatidão de 96% e uma precisão de 3,9%. Além disso, para avaliar possíveis perdas abióticas durante o período de incubação, foi realizada também a extração do fluoranteno do meio líquido, sem a presença de micro-organismos, e foi observada uma diminuição de 1,9% do fluoranteno para o meio líquido das após 10 dias de incubação e de 2,3% para o meio líquido dos fungos após 28 dias de incubação. Esses valores indicaram que a perda abiótica do fluoranteno no presente estudo foi insignificante. Como este HPA é considerado recalcitrante devido a sua elevada massa molecular, os resultados de biodegradação alcançados pelos micro-organismos isolados da turfa foram considerados satisfatórios.

5.4. Determinação dos Metabólitos

Com o intuito de investigar os prováveis metabólitos gerados durante a biodegradação, foi realizada a análise dos extratos utilizando o GC-MS. O cultivo dos micro-organismos na ausência do fluoranteno foi avaliado para possibilitar a

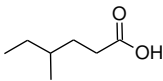
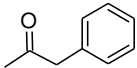
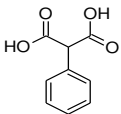
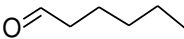
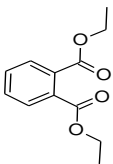

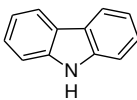
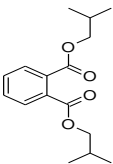
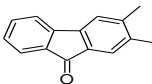

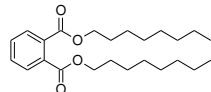
diferenciação entre os metabólitos produzidos naturalmente e os induzidos pela presença do HPA.

Desta forma, os cromatogramas dos extratos (com e sem a presença do fluoranteno) para cada micro-organismo, respectivamente, foram sobrepostos para a identificação dos sinais correspondentes aos metabólitos da biodegradação. Estes sinais foram analisados e selecionados de acordo com critérios de intensidade e resolução. Os metabólitos de interesse e seus espectros de massas correspondentes foram previamente identificados utilizando a biblioteca do equipamento com similaridade acima de 90% e sua identificação foi confirmada após a análise de fragmentação.

As vias de biodegradação do fluoranteno e seus metabólitos já foram estudados por diversos autores para diferentes micro-organismos (REHMANN *et al.*, 2001; PENG *et al.* 2008; CAO *et al.* 2015), porém para estes isolados da turfa não existe nenhum relato até o momento. Neste estudo, foi possível observar a presença de algumas estruturas moleculares relacionadas às relatadas na literatura. É importante frisar que o objetivo deste trabalho não foi propor uma via de biodegradação, mas mostrar os prováveis metabólitos produzidos nas condições de estudo pelos micro-organismos selecionados da turfa, evidenciando que o fluoranteno foi biodegradado por eles.

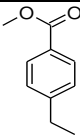
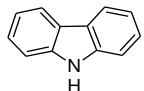
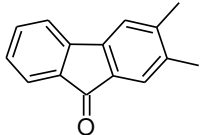
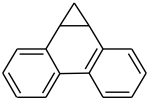
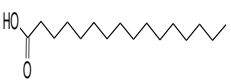
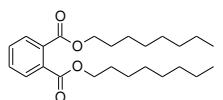
Os metabólitos encontrados para as bactérias e para os fungos estão descritos nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Analisando esses metabólitos, foi possível observar a presença de diferentes grupos funcionais, entre eles ácidos graxos, alcoóis, acetonas e aldeídos. Estruturas similares aos metabólitos fenilacetona e ácido fenilmalônico (Tabela 9) e metil 4-etilbenzoato (Tabela 10) foram descritos por Cao *et al.* (2015).

Tabela 9. Metabólitos identificados originados da biodegradação do fluoranteno por bactérias isoladas da turfa.

Bactéria	Metabólito	Molécula	Massa Molecular	Fórmula química	T _r (min.)
1	Ácido 4-Metil hexanóico		130	C ₇ H ₁₄ O ₂	5,62
1	Fenilacetona		134	C ₉ H ₁₀ O	7,36
1	Ácido fenilmalônico		180	C ₉ H ₈ O ₄	9,85
1	Hexanal		100	C ₆ H ₁₂ O	12,45
1	Dietil benzeno-1,2-dicarboxilato		222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	16,09
3	Tetradecanol		214	C ₁₄ H ₃₀ O	17,40
1,2,3	Carbazol		167	C ₁₂ H ₉ N	21,68
2,3	Bis(2-metilpropil) benzeno-1,2-dicarboxilato		278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	22,05
1,2,3	2,3-dimetil-9H-fluoren-9-ona		208	C ₁₅ H ₁₂ O	23,38
2	Docosonol		326	C ₂₂ H ₄₆ O	27,50
1,2,3	Bis (octil) benzeno - 1,2 dicarboxilato		390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	30,75

1: *Bacillus* sp. AC-19; **2:** *Bacillus* sp. AC-25; **3:** *Serratia* sp. AC-11. **T_r:** Tempo de retenção

Tabela 10. Metabólitos identificados originados da biodegradação do fluoranteno por fungos isolados da turfa.

Fungo	Metabólito	Molécula	Massa Molecular	Fórmula química	T _r (min.)
1	Metil 4-etilbenzoato		164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	11,26
1, 2, 3	Carbazol		167	C ₁₂ H ₉ N	21,68
1, 2, 3	2,3-dimetil-9H-fluoren-9-ona		208	C ₁₅ H ₁₂ O	23,38
1,2,3	Ciclopropa[1]fenantreno		192	C ₁₅ H ₁₂	23,12
3	Ácido Hexadecanóico		256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	23,46
1,2,3	Bis (octil) benzeno - 1,2 dicarboxilato		390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	30,75

1: *Fusarium* sp. AC-7; **2:** *Penicillium* sp. AC-1; **3:** *Penicillium* sp. AC-6. T_r: Tempo de retenção.

Além desses, também foi possível identificar compostos aromáticos com estruturas similares aos metabólitos do fluoranteno já descritos na literatura, mas com alguma substituição no anel como o 2,3-dimetil-9H-fluoren-9-ona, carbazol e o bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato. Estes três metabólitos foram encontrados em comum para todos os micro-organismos analisados.

A proposta de formação do metabólito 2,3-dimetil-9H-fluoren-9-ona pode ser explicada a partir da formação de um metabólito intermediário, o 9-fluorenona, já citado por vários autores (PENG *et al.*, 2008; KANALY; HARAYAMA, 2000). A formação da 9-fluorenona indica um ataque inicial na estrutura aromática do fluoranteno, provavelmente mediada por uma dioxigenase na posição 1 e 2 formando um intermediário dihidroxilado com subsequente clivagem meta deste intermediário (KELLEY *et al.*, 1993). Neste estudo, 9-fluorenona foi encontrado metilado nas posições C2 e C3, provavelmente devido à contribuição do perfil metabólico desses

micro-organismos isolados da Turfeira de Santo Amaro – SE, cujo perfil químico deste solo foi obtido por Romão *et al.* (2007) e Costa *et al.* (2012) indicando uma grande quantidade de compostos alifáticos. Sabendo-se que solos de turfa são formados pela decomposição microbiológica de plantas e animais em ambientes alagados, sugere-se existir uma influência entre esses micro-organismos que habitam o solo e o elevado teor de compostos alifáticos presentes na turfa, resultando em uma característica particular do metabolismo de fungos e bactérias em promover alifaticidade à matéria orgânica. Essa particularidade pode ser reforçada devido à formação de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa como metabólitos da biodegradação registrados neste estudo.

Com relação ao carbazol, não existe relato na literatura descrevendo-o como um metabólito do fluoranteno. Entretanto, de acordo com Loh e You (2000), esta molécula foi encontrada co-existindo com HPAs e com compostos fenólicos no ambiente. A estrutura do carbazol é muito semelhante a da 9-fluorenona, com uma substituição do grupo carbonil por um nitrogênio. Neste estudo, pode-se sugerir que este nitrogênio foi obtido do meio de cultura no qual estavam os micro-organismos, possivelmente mostrando uma influência do meio na formação de metabólitos de biodegradação.

O último metabólito encontrado em comum foi o bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato. Estudo realizado por Eaton (2001) mostrou que ésteres de ftalatos são metabólitos de determinados HPAs encontrados em combustíveis fósseis, incluindo o fluoranteno. De acordo com Engelhardt e Wallnofer (1978), ésteres de ftalatos podem ser hidrolizados por esterases em monoésteres e ácidos ftálicos, sendo este último descrito por diversos autores como um metabólito final da via de biodegradação do fluoranteno (CAO *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2008; REHMAN *et al.*, 2001). O ester ftálico identificado neste trabalho apresentou uma cadeia alifática longa, que reforça a provável característica particular desses micro-organismos em agregar alifaticidade em seus metabólitos.

Uma relação proporcional na formação do bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato e a taxa de biodegradação tanto para fungos (Figura 21) quanto para as bactérias (Figura 22), no período de incubação maior, foi constatada. Ou seja, o micro-organismo que gerou uma maior taxa de biodegradação, foi aquele que apresentou o pico cromatográfico do metabólito mais intenso.

Ademais, comparando-se os cromatogramas entre fungos e bactérias, foi observado que os fungos, os quais obtiveram maiores taxas de biodegradação quando

comparado às bactérias, apresentaram em geral sinais com maior intensidade nos cromatogramas.

Figura 21. Comparação dos cromatogramas do GC-MS do metabólito bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato para (a) *Penicillium* sp. AC-1; (b) *Penicillium* sp. AC-6; (c) *Fusarium* sp. AC-7 e (d) controle sem a presença de fluoranteno. Período de incubação de 28 dias.

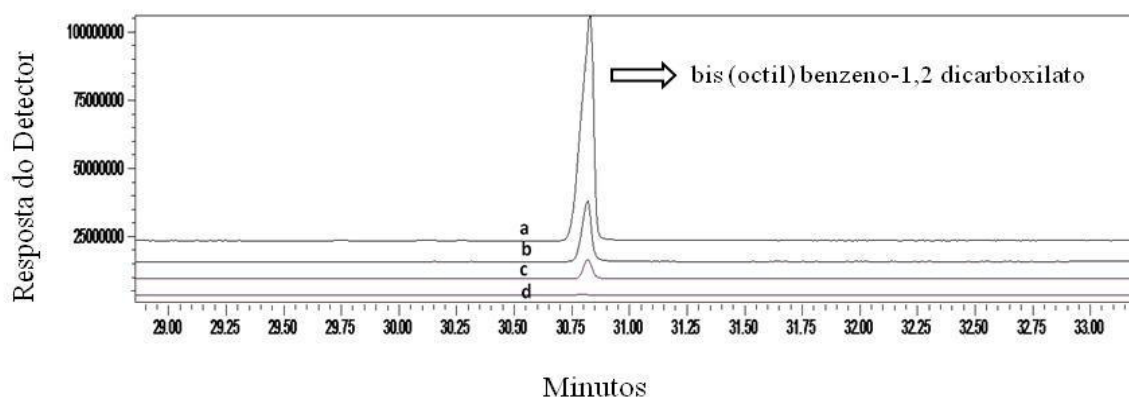
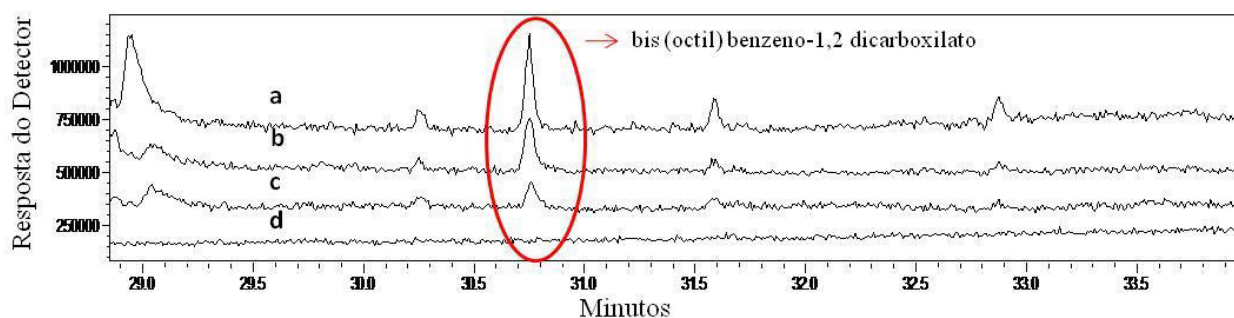


Figura 22. Comparação dos cromatogramas do GC-MS do metabólito bis (octil) benzeno-1,2 dicarboxilato para (a) *Bacillus* sp. AC-25; (b) *Bacillus* sp. AC-19; (c) *Serratia* sp. AC-11 and (d) controle sem a presença de fluoranteno. Período de incubação de 10 dias.



Analisando os metabólitos gerados pelos fungos (Tabela 10), foi observado a presença em comum do ciclopropa[1]fenantreno. Este metabólito apresenta estrutura similar a um epóxido com uma substituição do oxigênio pelo carbono. Estudos realizados por Haristash e Kaushik (2009) mostraram que monooxigenases presentes no sistema do citocromo P-450 geram epóxidos, os quais estão envolvidos na biodegradação de HPAs. No caso do ciclopropa[1]fenantreno identificado existe a possibilidade de ocorrer uma hidrólise formando um dihidrodiol, o qual foi descrito por Cerniglia (1993).

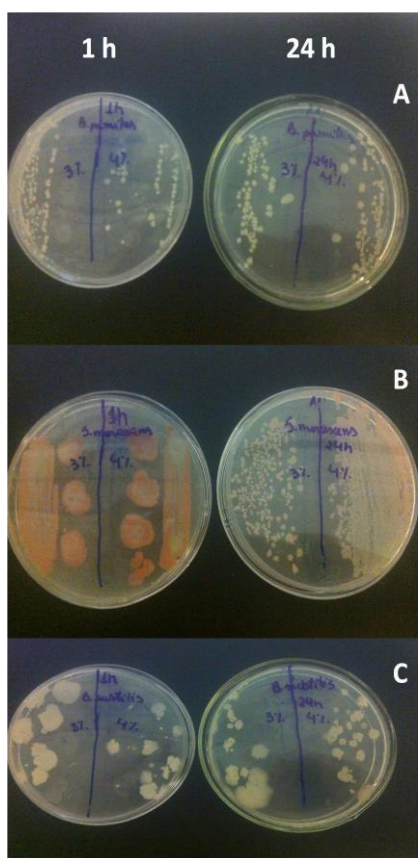
5.5. Imobilização da Bactéria em Quitosana

5.5.1. Testes Preliminares para escolha da Bactéria a ser Imobilizada

As bactérias isoladas foram testadas quanto à possibilidade de serem imobilizadas em quitosana. A triagem para escolher a que melhor se adaptaria a essa condição foi realizada nos testes de avaliação do efeito da quitosana sobre as cepas e o potencial de produzir quitosanase.

Inicialmente, as cepas bacterianas foram testadas com relação ao efeito da quitosana sobre as mesmas. Foi observado que todas elas foram resistentes até 4% de quitosana após 24h de incubação (Figura 23). Entretanto, ficou visualmente claro que o isolado *Serratia sp.* AC-11 foi o que melhor se desenvolveu sob essas condições visto que o seu crescimento em comparação as outras cepas foi maior. Esta resistência e o seu desenvolvimento em altas concentrações de quitosana fizeram com que este isolado fosse escolhido para dar prosseguimento com os testes. Além disso, possibilitou o uso da quitosana a 4% para a formação das esferas, o que de acordo com Costa *et al.* (2014) as tornam mais estáveis a etapa de agitação necessária aos experimentos de biodegradação.

Figura 23. Ensaio do efeito da quitosana (3% a esquerda da placa e 4% a direita da placa) sobre as bactérias isoladas após 1h e 24h de incubação. A: *Bacillus* sp. AC-25; B: *Serratia* sp. AC-11 e C: *Bacillus* sp. AC-19.



Posteriormente a este primeiro teste de triagem, foi realizado o ensaio da pesquisa da atividade quitosanásica da bactéria *Serratia* sp. AC-11.

As quitosanases são enzimas que hidrolisam especificamente a quitosana e não a quitina. Elas são produzidas tanto por micro-organismos, como também por plantas e tem um importante papel na alimentação e defesa desses indivíduos. A maioria dos micro-organismos que produzem esta enzima, constitutiva ou indutivamente, as secretam extracelularmente, enquanto que em plantas são encontradas geralmente quitosanases intracelulares. As quitosanases de diversas fontes mostram diferentes padrões de ação hidrolítica, os quais dependem do grau de polimerização e desacetilação do substrato (TADATHIL; VELLAPAN, 2014). Para um micro-organismo ser imobilizado em quitosana é necessário que ele resista à ação tóxica desse polissacarídeo e não produza enzimas quitinolíticas capazes de impedir a formação da matriz ou levar a sua desintegração, inviabilizando a sua utilização (ANGELIM *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014)

A avaliação da atividade quitosanásica do isolado *Serratia sp.* AC-11 foi realizada inoculando-se a bactéria em ágar quitosana, a fim de verificar se haveria a formação de halo em 48h de incubação. O resultado mostrou que após este período não houve a formação do halo de hidrólise ao redor do inóculo.

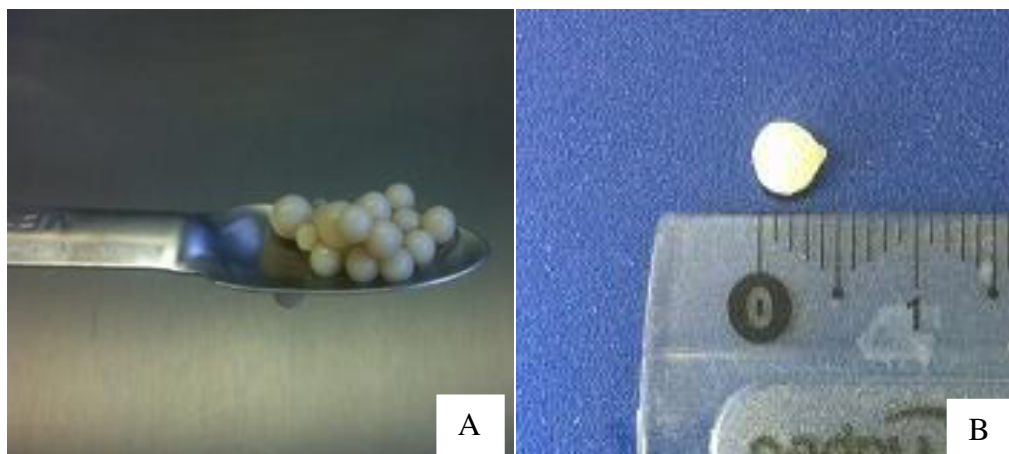
A digestibilidade da quitosana ou de qualquer outro suporte imobilizante só é desejado quando este funciona como um carreador de células ao sítio de ação. Sendo assim, após a chegada no ambiente, as células podem degradar o suporte e, consequentemente, serem liberadas no local (JOBIN *et al.*, 2005).

Considerando os resultados, a cepa da *Serratia sp.* AC-11 atendeu os requisitos iniciais para imobilização em esfera de quitosana.

5.5.2. Imobilização em Esfera de Quitosana

As esferas produzidas mostraram-se consistentes e uniformes, possuindo em média um diâmetro de 3 mm (Figura 24). O tamanho foi similar as esferas produzidas por Wang *et al.* (2005) e Barreto *et al.* (2010). Entretanto, foi observado que ocorreu a sua desintegração ao final do ensaio de biodegradação de 5 dias.

Figura 24. Aspecto geral das esferas de quitosana imobilizadas com o isolado *Serratia sp.* AC-11 (A) e diâmetro das esferas produzidas (B).



Para se tentar descobrir a causa dessa desintegração, foram realizadas medidas de pH do meio de cultura ao final do experimento, já que de acordo com Rabea *et al.* (2003), a quitosana é facilmente solúvel em pH ácido. Os valores de pH não variaram, entre o início do ensaio (valor $7,0 \pm 0,02$) e o final ($6,81 \pm 0,04$). Sendo assim, foi realizada uma nova pesquisa quitosanásica com a bactéria utilizando alíquotas da

cultura bacteriana do ensaio de biodegradação ao final do quinto dia, as quais foram inoculadas em ágar quitosana e deixadas em incubação por um período de 48h, a 32°C. Após este período, foi possível observar a formação do halo de hidrólise ao redor dos inóculos testados (Figura 25), confirmando a produção desta enzima nas condições experimentais. É possível sugerir que o prolongamento do ensaio com células imobilizadas tenha permitido a expressão do gene responsável pela produção da enzima quitosanase.

Figura 25. Pesquisa da atividade quitosanásica com inóculo (triplicata) crescido após 5 dias de incubação com esfera imobilizada.



As enzimas microbianas podem ser de expressão constitutiva ou indutiva. Na maioria das enzimas hidrolíticas, como é o caso da quitosanase, sua produção é controlada pela indução e repressão metabólica (GUPTA *et al.*, 2003). Este fato comprova a expressão indutiva desta enzima encontrada neste trabalho.

Estudo realizado por Barreto *et al.* (2010) também se deparou com este mesmo problema de desintegração das esferas. Para solucioná-lo foi realizado a reticulação da esfera após a imobilização com 0,3% de glutaraldeído por um período de 12 h.

De acordo com Migneault *et al.* (2004) o glutaraldeído é um dialdeído com 5 carbonos, saturado, linear e solúvel em todas as proporções de água e álcool, como também em todos os solventes orgânicos. Tem sido extensivamente usado como agente reticulante devido à disponibilidade comercial, baixo custo e alta reatividade e, por isso, é considerado mais eficiente que os outros aldeídos em gerar reticulações térmicas e quimicamente estáveis. Além disso, reage rapidamente com grupamento amina em pH

neutro. A ligação covalente entre o grupo amina da quitosana e o grupo aldeído do glutaraldeído é estável em amplas faixas de pH e de temperatura e é resistente a hidrólise enzimática. Por outro lado, o glutaraldeído não impede a biodegradação da quitosana em períodos longos, uma vez que não afeta a hidrólise enzimática das ligações β -1,4 da quitosana (MCCONNELL *et al.*, 2008).

Considerando os resultados satisfatórios encontrados por Barreto *et al.* (2010) no processo de reticulação das suas esferas, este mesmo procedimento metodológico foi testado para este estudo. Após a etapa de reticulação, as esferas foram lavadas três vezes com 100 mL de solução salina (NaCl 0,9%) para a retirada do excesso do agente reticulante e 1 g das esferas foi macerado em solução salina (NaCl 0,9%) e realizada a diluição sucessiva (sob condições estéreis) para a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc). Após as 24h de incubação a 32°C, não foi observado crescimento colonial, atestando que este procedimento foi letal para as células, o que inviabiliza o processo. Possivelmente, a sobrevivência das células de Barreto *et al.* (2010) está no fato de que elas estão na forma de esporos, os quais são mais resistentes a condições adversas do que as células vegetativas de *Serratia sp.* AC-11 utilizadas neste trabalho.

Foi realizada uma nova tentativa de reticulação com o glutaraldeído com a concentração a 0,2% por um período de apenas 1 hora, o qual já foi suficiente para gerar uma mudança de coloração na esfera de bege para alaranjado, o que segundo Leite *et al.* (2005) evidencia a reação dos grupos aldeídos do glutaraldeído com as aminas presentes na quitosana. Após este novo procedimento de reticulação, foi executada a contagem de unidades formadoras de colônias, como já descrito acima. Foi observado o valor de $3,4 \times 10^6$ ufc/g para as esferas imobilizadas que passaram pelo processo de reticulação com 0,2% de glutaraldeído por 1h. Para comparar possíveis diferenças com um controle, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias para esferas que não passaram pelo processo de reticulação, obtendo-se então o valor de 10×10^6 ufc/g. O resultado demonstrou que houve perdas devido ao processo de reticulação, porém estas perdas encontradas não inviabilizariam o uso destas esferas reticuladas no ensaio de biodegradação.

Com relação a sua morfologia inicial, as esferas imobilizadas e reticuladas não apresentaram diferença visual quando comparadas as esferas sem reticulação, com exceção da coloração (Figura 26). Ao final do período de 10 dias do ensaio de biodegradação, pode-se notar que as esferas reticuladas mostraram-se intactas e íntegras

quando comparadas as esferas sem reticulação, demonstrando a resistência adquirida por este procedimento (Figura 27).

Figura 26. Esferas de quitosana imobilizadas com o isolado *Serratia* sp. AC-11 sem reticulação (A) e reticulada com 0,2% de glutaraldeído por 1h (B).

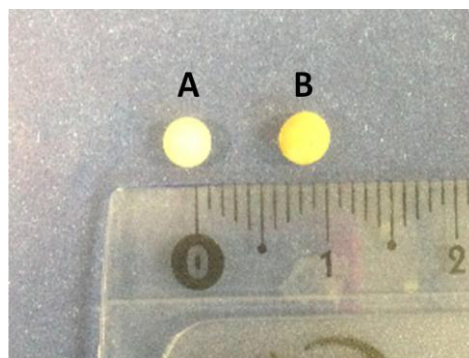


Figura 27. Esfera de quitosana imobilizada com o isolado *Serratia* sp. AC-11 ao final do período de 10 dias do ensaio de biodegradação do fluoranteno. (A) Esfera sem reticulação; (B) Esfera reticulada com 0,2% de glutaraldeído por 1h.



5.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de visualizar a morfologia das superfícies das esferas de quitosana com e sem imobilização (Figura 28), assim como reticulada com glutaraldeído e imobilizada (Figura 29), foi realizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 28. Micrografias das esferas de quitosana sem reticulação: (A1) Sem imobilização com aumento de 100x; (A2) Superfície da esfera sem imobilização, aumento de 1000x; (B1) Esfera imobilizada com aumento de 50x; (B2) Superfície da esfera com imobilização, aumento de 1000x.

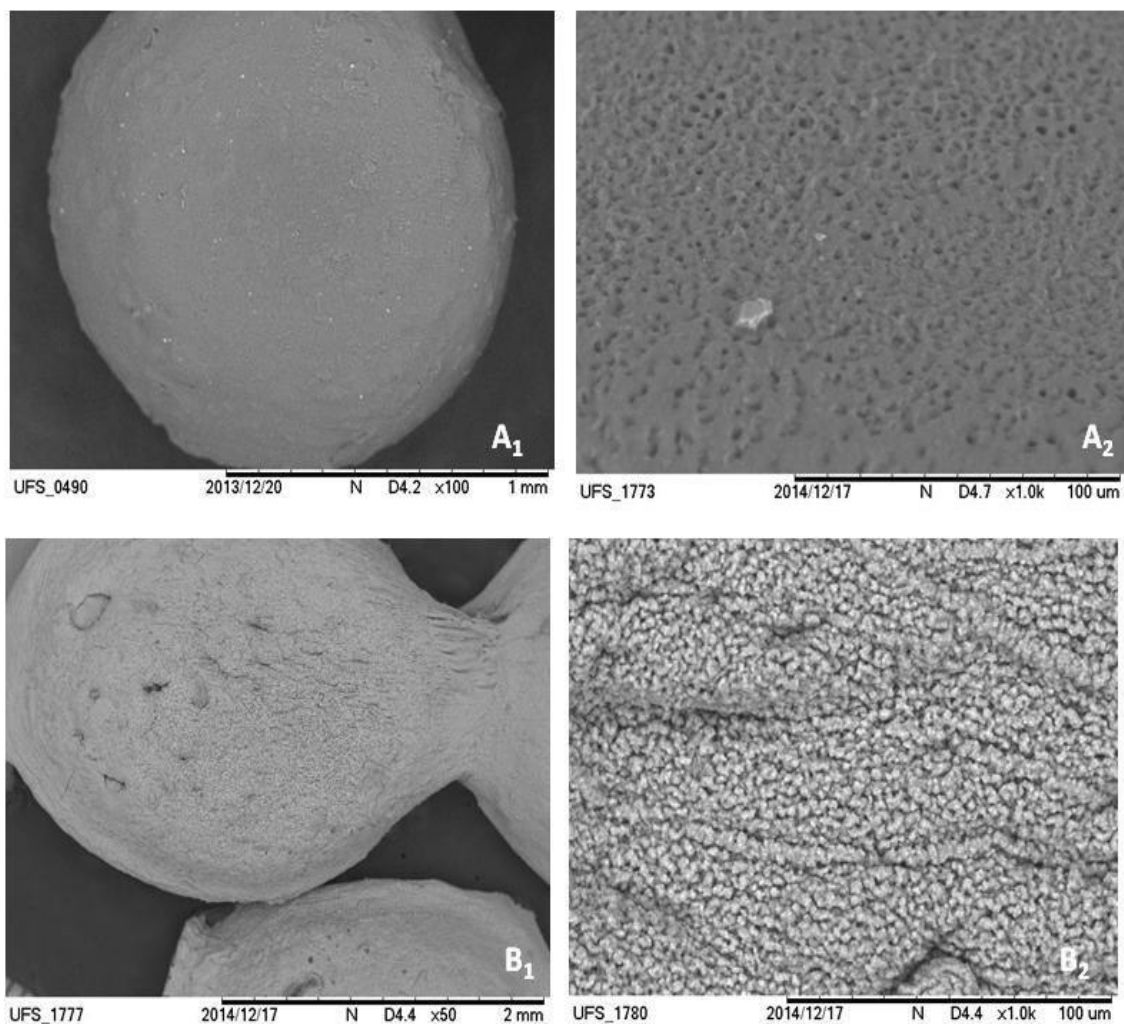
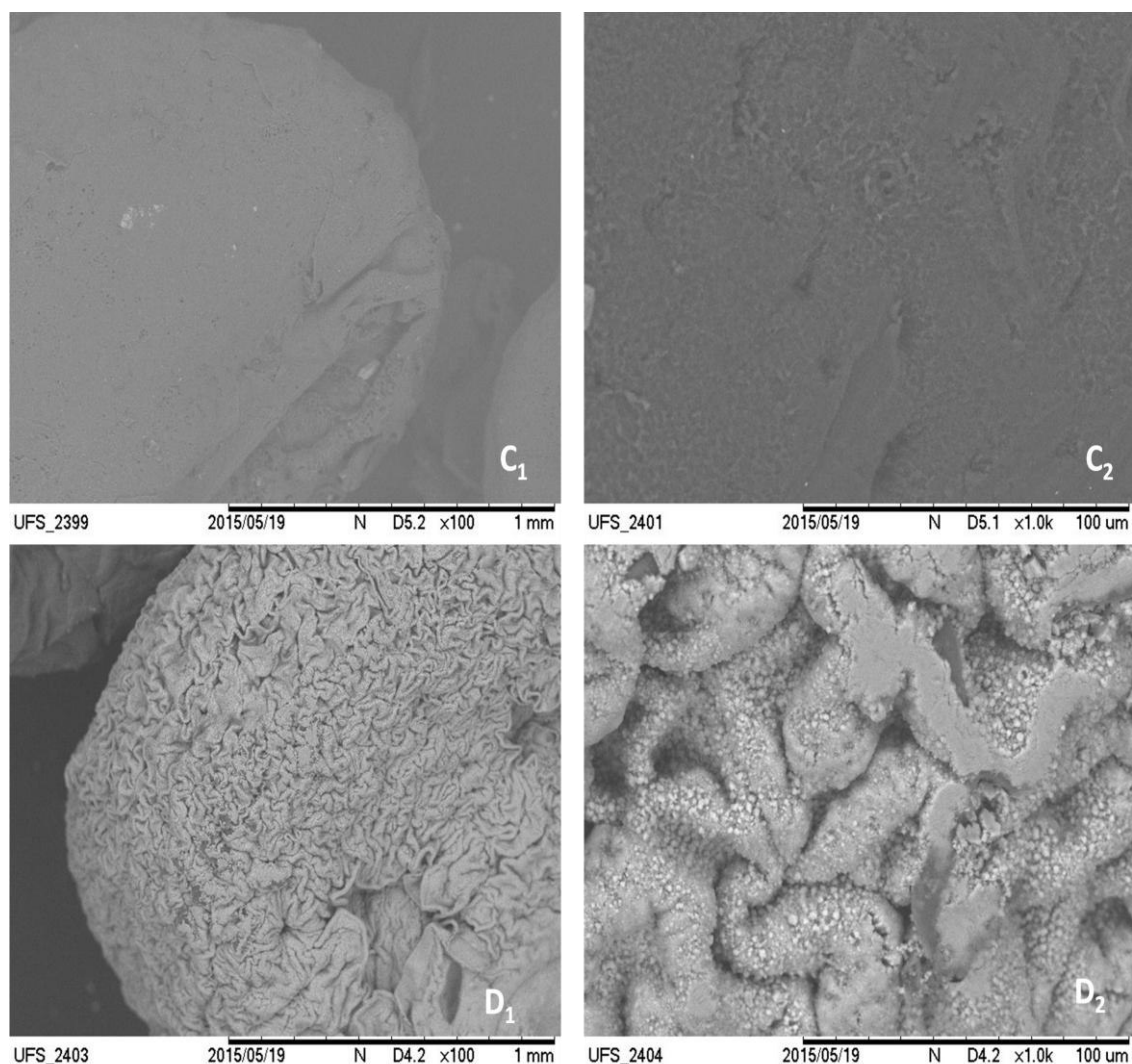


Figura 29. Micrografias das esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído: (C1) Sem imobilização com aumento de 100x; (C2) Superfície da esfera sem imobilização, aumento de 1000x; (D1) Esfera imobilizada com aumento de 100x; (D2) Superfície da esfera com imobilização, aumento de 1000x.



As micrografias confirmaram a esfericidade da morfologia para as esferas de quitosana produzidas. Além disso, foi possível constatar uma diferença entre as esferas com e sem imobilização, independente da reticulação.

Comparando-se os dois tipos de esferas sem imobilização, foi observado que a esfera não reticulada apresenta uma superfície mais irregular, com abundante presença de cavidades, o que difere da superfície da esfera reticulada, a qual apresenta-se mais regular e com pouca presença de cavidades. De acordo com Beppu *et al.* (1999) a reticulação com glutaraldeído faz com que a superfície da matriz de quitosana esteja munida com grupamentos diferentes das aminas iniciais, mudando as características mecânicas e químicas desta superfície e tornando a membrana da quitosana mais

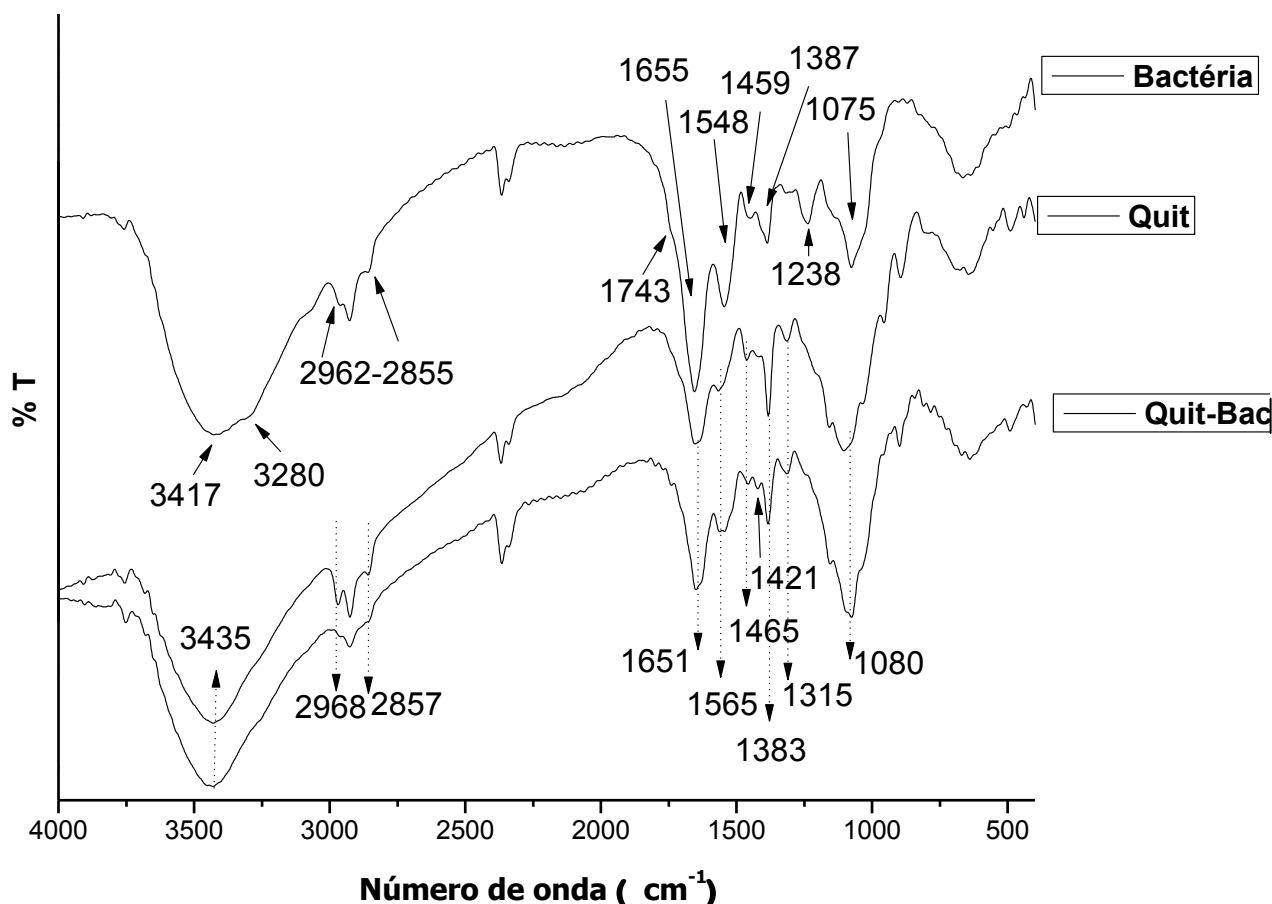
hidrofóbica. Este fato possivelmente pode ser responsável pela pouca presença de cavidades observadas nas esferas reticuladas.

As micrografias dos fragmentos das esferas imobilizadas com a bactéria, tanto sem e com reticulação, mostraram uma superfície mais heterogênea, enrugada e granulosa, denotando a presença e proliferação da comunidade bacteriana em toda a superfície, possibilitando a visualização do biofilme. A esfera reticulada e imobilizada mostrou uma enrugação da superfície maior que a esfera imobilizada e não reticulada, podendo esta enrugação ser atribuída a uma estratégia que facilita a colonização e aumento da biomassa bacteriana, como já demonstrado por Hsieh *et al.* (2008).

5.5.4. Análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR da bactéria *Serratia* ap. AC-11 e das esferas de quitosana reticuladas com e sem imobilização, respectivamente, foram realizados (Figura 30). Os espectros de infravermelho fornecem informações através dos formatos das bandas de absorção, frequências e intensidade dessas bandas, possibilitando a identificação de grupos funcionais que compõem os materiais. Dessa forma, esta análise torna-se importante na caracterização e na predição de interações químicas nos diferentes tipos de esferas preparadas.

Figura 30. Espectros na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) para as amostras de bactéria *Serratia* sp. AC-11, quitosana (Quit) e esferas de quitosana imobilizadas com a bactéria *Serratia* sp. AC-11 (Quit-Bac).



O espectro de infravermelho da bactéria apresentou banda larga de absorção centrada em 3417 cm^{-1} e um ombro em 3280 cm^{-1} atribuídas à sobreposição dos grupos O-H de estruturas lipídicas e carboidratos, e N-H de proteínas, em ligação de hidrogênio.

As bandas nas regiões entre $2962 - 2855\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento da ligação C-H em estruturas alifáticas, sendo confirmadas pela banda de dobramento assimétrico em 1459 cm^{-1} e pelo dobramento assimétrico em 1387 cm^{-1} , ambas relacionadas com a presença de lipídios. A presença de um ombro em 1743 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=O de ésteres alifáticos, os quais podem estar relacionados às estruturas lipídicas presentes na biomassa bactéria.

As bandas em 1655 cm^{-1} e 1548 cm^{-1} são atribuídas os estiramentos C=O de amida e dobramento N-H de amida, respectivamente, onde sua presença é confirmada em

praticamente todos os espectros FT-IR de bactérias (NAUMANN, 2000). A banda de absorção em 1238 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento simétrico de grupos fosfatos (P=O) característicos de ácidos nucleicos (GRUBE *et al.*, 2013) e a banda larga centrada em 1075 cm^{-1} está associada aos complexos modos vibracionais da ligação C-O de polissacarídeos (NAUMMAN, 2000).

No espectro de absorção no infravermelho da quitosana a banda larga e intensa em 3435 cm^{-1} referente à sobreposição dos grupos O-H e N-H em ligações de hidrogênio. As bandas entre $2968\text{-}2857\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas aos estiramentos C-H de alifáticos, em que foram confirmados pelas bandas de dobramento assimétrico (1465 cm^{-1}) e simétrico (1383 cm^{-1}) da ligação C-H. A banda em 1654 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=O de amidas e em 1315 cm^{-1} ao estiramento C-N do grupo amida. A banda em 1565 cm^{-1} é atribuída ao dobramento da ligação N-H de amina. A banda intensa em 1080 cm^{-1} e o ombro em 1158 cm^{-1} são atribuídos aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-O-C do anel glicopiranosídeo, respectivamente (KASSAI, 2008).

O espectro de infravermelho das esferas de quitosana imobilizada com bactéria não apresentou modificações em seus estiramentos de ligação que poderiam caracterizar interações químicas específicas entre as biomassas precursoras. O espectro apresentou características similares que correspondem à sobreposição de bandas características das biomassas precursoras, como o aumento na intensidade das bandas em 1651 cm^{-1} e 1565 cm^{-1} referentes à contribuição das amidas, e o alargamento da banda em 3435 cm^{-1} atribuída aos grupos O-H e N-H em ambas as biomassas. Dessa forma, pode-se inferir que no processo de imobilização a quitosana funcionou como meio de envolvimento (suporte polimérico) para biomassa bacteriana, em que a bactéria *Serratia* sp. AC-11 foi envolvida pelo biopolímero quitosana, possibilitando o seu aprisionamento através de um processo mecânico. Esse comportamento pode ser confrontado através das fotomicrografias obtidas em magnificação de 1000 vezes (Figura 29- D2), em que se pode observar a disposição dos bacilos na superfície enrugada da quitosana após reticulação com glutaraldeído.

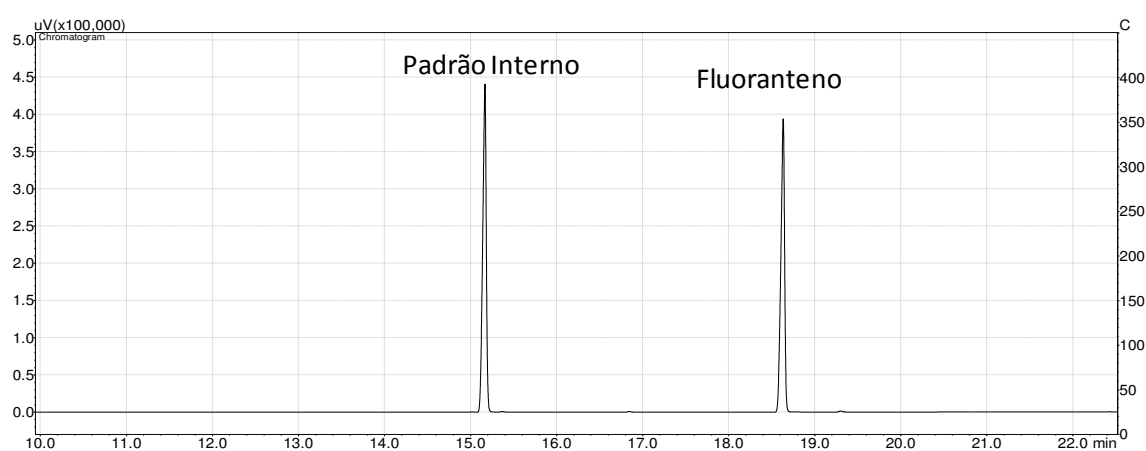
5.5.5. Ensaio de Biodegradação com Bactéria Imobilizada na Esfera de Quitosana

Foi analisada a biodegradação do fluoranteno com a esfera de quitosana imobilizada com o isolado *Serratia* sp. AC-11 e reticulada com 0,2% de glutaraldeído

para os períodos de 5 e 10 dias, que correspondem aos mesmos períodos utilizados no ensaio de biodegradação com a célula livre.

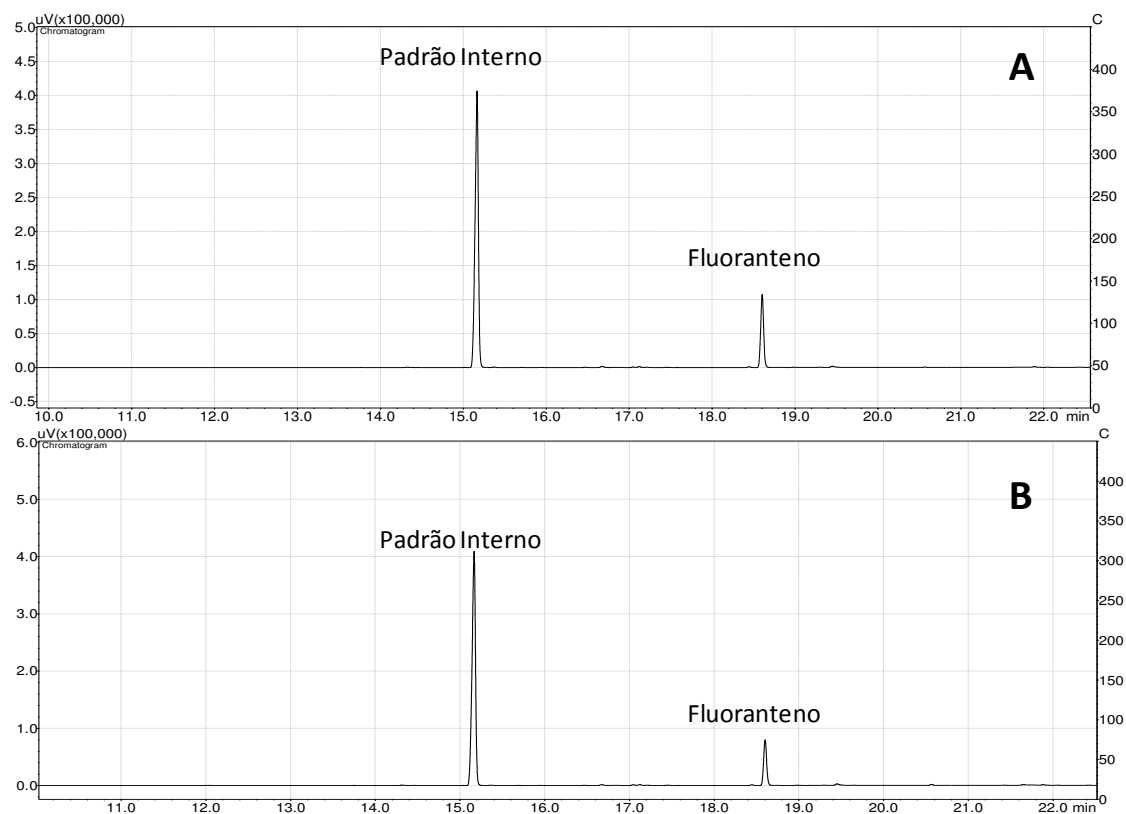
Inicialmente, foi testada a esfera de quitosana sem imobilização (controle) para verificar a adsorção do fluoranteno do meio. De acordo com o cromatograma obtido por GC-FID para este ensaio (Figura 31), foi observado que houve apenas uma redução de 3,7% do fluoranteno, sendo esta pequena perda desprezível, podendo ser atribuída também a fatores abióticos, como já mencionado no item 5.4.

Figura 31. Cromatograma obtido por GC-FID do ensaio de degradação do fluoranteno com a esfera de quitosana sem imobilização (controle - 10 dias).



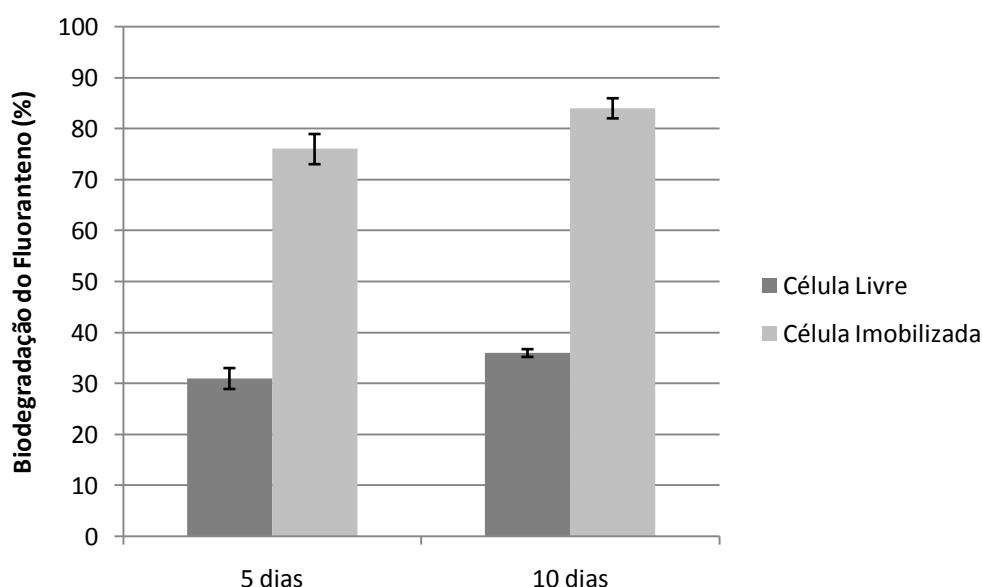
A partir disso, foi avaliada a esfera de quitosana imobilizada com a bactéria e reticulada com glutaraldeído 0,2% na biodegradação do fluoranteno. Foi observada uma taxa de degradação de 76% para o período de incubação de 5 dias e de 84% para o período de 10 dias de incubação (Figura 32).

Figura 32. Cromatograma obtido por GC-FID do ensaio de biodegradação do fluoranteno com a esfera de quitosana imobilizada com o isolado *Serratia* sp. AC-11 e reticulada no período de 5 dias (A) e 10 dias (B).



Comparando-se os resultados da biodegradação entre a célula livre e a célula imobilizada, foi observado que houve uma diferença de quase 50% a mais na biodegradação do fluoranteno quando se utilizou a célula imobilizada para ambos os períodos testados (Figura 33).

Figura 33. Comparação entre a porcentagem de degradação do fluoranteno para a célula livre e imobilizada no período de 5 e 10 dias, respectivamente. A barra de erros representa o desvio padrão amostral.



Com o intuito de se verificar o número de células viáveis nas esferas após os períodos de biodegradação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia. Após o período de 5 dias foi obtido o valor de 23×10^6 ufc/g e após 10 dias, 170×10^6 ufc/g. Esses resultados demonstraram que houve recuperação do número de células perdidas durante o processo de imobilização e reticulação das esferas de quitosana e ainda observa-se também que as células foram capazes de continuar se multiplicando no período mais longo de incubação. Resultados similares de crescimento da biomassa nas esferas de quitosana foram encontrados por Costa *et al.* (2014) e Barreto *et al.* (2010).

As esferas imobilizadas foram ainda avaliadas em sua eficiência de degradação em períodos de tempo menores que 5 dias, visando a possibilidade de resultados mais rápidos. De acordo com a Tabela 11, pode-se observar que em apenas 1 dia de incubação, elas foram capazes de degradar 56% do fluoranteno, tendo esta taxa sido aumentada ao longo dos dias seguintes. A determinação do número de células viáveis nesses respectivos dias revelou a capacidade da bactéria em crescer e se multiplicar durante os dias consecutivos de incubação, o que refletiu diretamente na maior biodegradação do composto.

Tabela 11. Taxa de biodegradação do fluoranteno (100 mg L^{-1}) pelas esferas de quitosana imobilizadas com a bactéria *Serratia* sp. AC-11 durante dias consecutivos de incubação e a respectiva contagem de unidades formadoras de colônia (ufc/g).

Dias	Taxa de biodegradação (%)	UFC/g
1	56,0	$2,1 \times 10^6$
2	61,5	$2,6 \times 10^6$
3	62,5	$3,4 \times 10^6$
4	71,5	$7,3 \times 10^6$
5	76,0	23×10^6
10	84,0	170×10^6

A imobilização oferece um potencial promissor no aumento da eficiência de bioprocessos como pôde ser observado neste trabalho. Diversos estudos evidenciam um aumento na eficiência em processos de biotransformação (GUO *et al.*, 2006), biodegradação (VIGGIANI *et al.*, 2006) e produção de enzima (PRASAD *et al.*, 2005) com o uso de células imobilizadas utilizando micro-organismos.

Em relação à escolha do suporte quitosana, uma das grandes vantagens consiste em se reutilizar uma matéria-prima que seria descartada no ambiente, a quitina, e transformá-la em um produto, o qual já é utilizado na preservação de alimentos (DUTTA *et al.*, 2009), na indústria farmacêutica (SHI *et al.*, 2006), na agricultura (EL-TAHANY *et al.*, 2012), na biorremediação de xenobióticos (MORAES *et al.*, 2013), entre outros.

O uso de esferas de quitosana como suporte para imobilização de micro-organismos e suas aplicações ambientais já vem sendo relatada em alguns estudos, entretanto neste trabalho representa a primeira vez em que é descrito uma espécie de *Serratia* sp., imobilizada em esfera de quitosana para utilização na biodegradação de HPA. Estudo realizado por Angelim *et al.* (2013) desenvolveram uma estratégia de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo contendo consórcio de bactéria imobilizada em esferas de quitosana. Estudo realizado por Costa *et al.* (2014), apresentaram o uso de células vegetativas de *B. pumillus* em esfera de quitosana e obtiveram a degradação de 90,8% de hexadecano. Barreto *et al.* (2010) imobilizaram esporos de *B. subtilis* e alcançaram um degradação de quase 100% de n-hexadecano em

48h. Trabalho realizado por Hsieh *et al.* (2008), avaliou a imobilização de *Pseudomonas putida* em esferas de quitosana para degradação de fenol e observou que a imobilização aumentou a tolerância das células a concentrações elevadas deste composto, assim como a sua sobrevivência, crescimento e taxa de biodegradação.

Ainda de acordo com Hsieh *et al.* (2008), as esferas de quitosana imobilizadas não só protegeram as células contra estresses ambientais, mas também proporcionaram um ambiente apropriado para o crescimento celular e metabolismo para formação de biofilme. Estas características fazem com que as células imobilizadas apresentem as vantagens observadas nos diversos estudos citados.

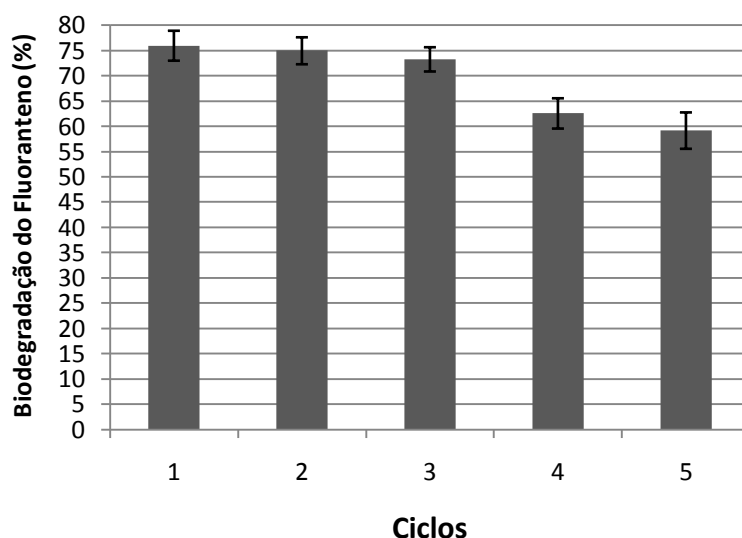
5.5.6. Reutilização das esferas imobilizadas

Segundo Covizzi *et al.* (2007), a reutilização das células imobilizadas é considerada uma das grandes vantagens da técnica de imobilização celular principalmente quando os suportes escolhidos para imobilização são inertes e apresentam alta resistência mecânica.

Com o intuito de avaliar essa vantagem nas esferas imobilizadas produzidas neste trabalho, elas foram submetidas a contínuos ciclos de biodegradação.

Como a biodegradação por esferas imobilizadas no período de 10 dias (84%) apresentou uma diferença pequena quando comparada a biodegradação no período de 5 dias (76%), sendo que esta taxa não foi diretamente proporcional ao tempo de incubação, optou-se em utilizar ciclos contínuos com períodos de incubação de 5 dias. Esta escolha do período considerou alguns fatores como o consumo de energia do equipamento de agitação (shaker) e tempo de execução do procedimento para obtenção dos resultados, visando um uso mais vantajoso para uma possível aplicação em escala industrial. Os resultados encontrados para a reutilização das esferas encontram-se demonstrados na Figura 34.

Figura 34. Porcentagem de biodegradação do fluoranteno pelas esferas imobilizadas e reticuladas durante os ciclos contínuos de reutilização. A barra de erro representa o desvio padrão amostral.



Foi observado que as esferas imobilizadas após ciclos contínuos de reuso permaneceram biodegradando o fluoranteno, apresentando uma diferença percentual de biodegradação de 17% entre o primeiro ciclo (76%) e o quinto e último ciclo (59%). Se compararmos a diferença entre o primeiro e o terceiro ciclo, que correspondeu a faixa de menor variação foi verificado uma diferença de apenas 3% na taxa de biodegradação, a qual pode ser desprezada, caso seja considerado o desvio padrão amostral.

Além disso, foi constatado que ao final do quinto ciclo de reuso, a maioria das esferas ainda se encontravam íntegras, como pode ser observado na Figura 35.

Figura 35. Esferas imobilizadas após o quinto ciclo de reutilização.



A integridade das esferas é essencial para o seu reuso e para uma possível aplicação em processos industriais com condições controladas, em que a estabilidade e rigidez são características importantes. Além disso, de acordo com Costa *et al.* (2014), o reuso de células imobilizadas reduz custos operacionais e aumenta a eficiência, fazendo com que as bactérias fiquem estáveis e ativas por longos períodos.

Para se verificar a viabilidade das células ao final do experimento de reutilização, foi realizada a contagem de células viáveis ao final do último ciclo e observado um valor de $1,9 \times 10^6$ ufc/g, demonstrando que as células permaneceram ativas e estáveis.

Segundo Hsieh *et al.* (2008) e Elnashar (2011), o uso de micro-organismos imobilizados vem crescendo devido as vantagens em relação às células livres, como: a possibilidade de reutilização, maior controle dos bioprocessos, fácil recuperação, maior estabilidade catalítica, menor suscetibilidade de contaminação por outros micro-organismos indesejáveis, maior resistência contra intempéries ambientais e maior eficiência de degradação de compostos xenobióticos. Os resultados encontrados corroboram essas vantagens descritas.

Além do uso de células imobilizadas na escala laboratorial de experimentos em erlenmeyrs, estudo realizado por Sarma e Pakshirajan (2011) investigou também o uso da bactéria *M. frederiksborgense* imobilizada em alginato de cálcio para degradação de 1000 mg L^{-1} de pireno utilizando biorreatores. Os resultados mostraram que nestas condições, o HPA foi completamente degradado em uma taxa de $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ que é o maior valor relatado para a degradação do pireno. Isto demonstra a potencial aplicação de micro-organismos imobilizados em possíveis escalas industriais de uso.

A eficiência de biodegradação das esferas de quitosana imobilizadas com a bactéria *Serratia* sp. AC-11 produzidas neste trabalho foi surpreendente por pelo menos quatro aspectos. O primeiro e mais importante deles, do ponto de vista de remediação, foi à inquestionável melhora na taxa de biodegradação do HPA. O segundo reporta o fato do ambiente criado pelas esferas de quitosana favorecer o crescimento e estabilidade das células bacterianas. O terceiro aspecto considera a escolha do suporte quitosana, que é um biopolímero natural, biodegradável, derivado de uma matéria-prima, a quitina, a qual seria descartada no ambiente e que agora pode ter uma nova aplicação biotecnológica. Por último, está o fato das esferas apresentarem a possibilidade de reutilização em ciclos contínuos de uso.

Desta forma, as esferas imobilizadas com o isolado *Serratia* sp. AC-11 representam um novo bioproduto caracterizado principalmente por ser eco-amigável, possuir baixo custo associado e eficiência de degradação. Estas características observadas fortalecem a idéia de uma potencial aplicação destas esferas em escala industrial para fins de biorremediação de locais contaminados por HPA.

6. CONCLUSÕES

Este é um trabalho pioneiro que explora pela primeira vez a microbiota da turfa de Santo Amaro das Brotas –SE, para fins biotecnológicos de biodegradação do fluoranteno. Os resultados encontrados contribuíram para um maior conhecimento da diversidade microbiana desta turfeira, mostrando o seu potencial microbiológico.

A partir deste solo, foi possível isolar seis micro-organismos que biodegradaram satisfatoriamente o fluoranteno em dois diferentes períodos analisados. O sequenciamento genômico identificou estes micro-organismos como pertencentes aos gêneros: *Bacillus*, *Serratia*, *Penicillium* e *Fusarium*.

A análise dos metabólitos gerados durante a biodegradação revelou a presença de diferentes grupos funcionais, além da presença de três metabólitos em comum aos micro-organismos testados: 2,3-dimetil-9H-fluoren-9-ona, carbazol e bis (octil) benzeno-1,2-dicarboxilato. Muitos desses metabólitos apresentaram grupamentos alifáticos, o que sugere uma particularidade no metabolismo desses micro-organismos em formá-los e, este fato, pode estar relacionado com o perfil químico da turfa.

Como obtenção de um produto biotecnológico a partir dos micro-organismos isolados, foi possível desenvolver esferas de quitosana imobilizadas com o isolado *Serratia* sp. AC-11. Estas esferas foram capazes de degradar 56% do fluoranteno em apenas 1 dia e quando comparadas a utilização de células livres, apresentaram uma eficiência de biodegradação de quase 50% a mais nos períodos de 5 e 10 dias, degradando 75% e 84% nos referidos períodos.

As esferas imobilizadas apresentaram ainda a capacidade de reutilização em diferentes ciclos contínuos de uso com biodegradação elevada do fluoranteno, o que oferece uma vantagem direta para uma aplicação em escala industrial, pois diminui custos operacionais.

O sucesso da imobilização do isolado *Serratia* sp. AC-11 em esferas de quitosana oferece uma nova abordagem para a biodegradação do fluoranteno sugerindo

uma solução eficiente, de baixo custo, prático, eco-amigável e com potencial aplicação em escala industrial para uso na biorremediação de áreas contaminadas por este HPA.

7. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- 1) Analisar o perfil genômico e enzimático dos micro-organismos isolados da Turfa visando não só a caracterização do metabolismo deles, como também a descoberta de possíveis genes e enzimas de interesse biotecnológico;
- 2) Avaliar o uso de consórcio bacteriano, fúngico e misto na biodegradação do fluoranteno, tendo como objetivo retratar os processos naturais de biodegradação, no qual existe uma comunidade de micro-organismos envolvidos;
- 3) Testar o uso das esferas imobilizadas em biorreatores para observar a eficiência de degradação do fluoranteno e compará-la com a escala laboratorial;
- 4) Avaliar o uso das esferas imobilizadas com a bactéria *Serratia* sp. AC-11 na biodegradação de outros HPAs;

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA DISCENTE DURANTE O DOUTORADO

➤ Co-autoria em 2 artigos:

Costa, José A. S.; **Garcia, A.C.F.S** ; Santos, D. ; Mesquita, M. E. ; Romao, L. P. C. . Applications of inorganic-organic mesoporous materials constructed by self-assembly processes for removal of benzo[k]fluoranthene and benzo[b]fluoranthene. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 75, p. 495-507, 2015.

Costa, José A. S.; **Garcia, Anuska C. F. S.** ; Santos, Danilo O. ; Sarmiento, VICTOR H. V. ; Porto, André L. M. ; Mesquita, Maria E. De ; Romão, Luciane P. C. . A New Functionalized MCM-41 Mesoporous Material for Use in Environmental Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v. 25, p. 197-207, 2013.

➤ **Submissão de 2 artigos derivados da tese:**

Garcia, A.C.F.S.; Araújo, B.R.; Diniz, L.E.C.; Romão, L.P.C. **New Biotechnological Approach for PAH Degradation using Bacteria from Tropical Peat Entrapped in Chitosan Beads.**

Submetido para a revista **Journal of Hazardous Materials** (Fator de Impacto 4,5) (Ver Apêndice A)

Garcia, A.C.F.S.; Araújo, B.R.; Birolli, W.G.; Marques, C.G.; Barbosa Júnior, A.M.; Diniz, L.E.C.; Porto, A.L.M.; Romão, L.P.C. **Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon by Fungi Biodiversity from Tropical Peat.**

Submetido para a revista **Environmental Science: Process & Impacts** (Fator de Impacto 2,17) (Ver Apêndice B)

9. REFERÊNCIAS

- AKCHA, F.; IZUEL, C.; BUDZINSKI, H.; BURGEOT, T.; NARBONNE, J.F. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology** 49, 269-287, 2000.
- ADINARAYANA, K.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Production of Alkaline Protease with Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique. **AAPS PharmSciTech** 6: 391-397, 2005.
- ALMEIDA, A.C.M.; PEDRO, R.J.; CORSO, C.R. Remoção de corante têxtil por turfa nativa através de adsorção em diferentes concentrações hidrogeniônicas. **Arquivos do Instituto Biológico** 71: 675-677, 2004.
- ALOMIRAH, H.; AL-ZENKI, S.; AL-HOOTI, S.; ZAGHLOUL S.; SAWAY, W.; AHMED, N.; KANNAN, K. Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. **Food Control** 22: 2028-2035, 2011.
- ALVARENGA, N.; BIROLI, W.G.; SELEGHIM, M.H.R.; PORTO, A.L.M. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. **Chemosphere** 117: 47-52, 2014.
- ANDERSEN, R.; CHAPMAN, S.J.; ARTZ, R.R.E. Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. **Soil Biology & Biochemistry** 57, 979-994, 2013.
- ANGELIM, A. L.; COSTA, S. P.; FARIAS, B.C.S.; AQUINO, L.F.; MELO, V. M. M. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management** 127: 10-17, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215: 403-410, 1990.
- AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos** 2: 27-34, 2007.
- BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 80:723–736, 2005.
- BANDOWE, B.A.M.; BIGALKE, M.; BOAMAH, L.; NYARKO, E.; SAALIA, F.K.; WILCKE, W. Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment. **Environment International** 65:135–146, 2014.
- BANDOWE, B.A.M.; NKANSAH, M.A. Occurrence, distribution and health risk from polycyclic aromatic compounds (PAHs, oxygenated-PAHs and azaarenes) in street dust

from a major West African Metropolis. **Science of the Total Environment** 553: 439 - 449, 2016.

BARRETO, R.V.G.; HISSA, D.C.; PAES, F.A.; GRANGEIRO, T.B.; NASCIMENTO, R.F.; REBELO, L.M.; CRAVEIRO, A.A.; MELO, V.M.M. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. **Bioresource Technology** 101: 2121–2125, 2010.

BATISTA, A. P. S.; ROMÃO, L. P. C.; ARGUELHO, M. L. P. M.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P.; PASSOS, E. A.; ROSA, A. H. Biosorption of Cr (III) using in natura and chemically treated tropical peats. **Journal of Hazardous Material**, 163: 517- 523, 2009.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 9: 163-169, 1999.

BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **Journal of Applied Microbiology** 98: 272-284, 2005.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of enzymes and cells. In: SHUMAUDER, H. P. (org.) **Methods in Biotechnology**. Totowa: Humana press, v.1, pg. 1-11, 1997.

BISHT, S.; PANDEY, P.; KAUR, G.; AGGARWAL, H.; SOOD, A.; SHARMA, S.; KUMAR, V. Utilization of endophytic strain *Bacillus sp.* SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. **European Journal of Soil Biology** 60:67-76, 2014.

BOMFIM, L.F.C.; COSTA, I. V. G.; BENVENUTI, S.M.P. (Orgs.). Ministério de Minas e Energia. Projeto Cadastro da Infra-Estrutura Hídrica do Nordeste: Estado de Sergipe. **Diagnóstico do município de Santo Amaro das Brotas**. 23 páginas. 2002. Disponível em: <
<http://www.cprm.gov.br/arquivos/pdf/dehid/Sergipe/Amarobrotas.pdf>> Acesso em 20 de janeiro de 2015.

BORTEY-SAM, N.; IKENAKA, Y.; NAKAYAMA, S.M.M.; AKOTO, O.; YOHANNES, Y.B.; BAIDOO, E.; MIZUKAWA, H.; ISHIZUKA, M. Occurrence, distribution, sources and toxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface soils from the Kumasi Metropolis, Ghana. **Science of the Total Environment** 496: 471-478, 2014.

BRAGAZZA, L.; SIFFIA, C.; IACUMIN, P.; GERDOL, R. Mass loss and nutrient release during litter decay in peatland: The role of microbial adaptability to litter chemistry. **Soil Biology & Biochemistry** 39, 257–267, 2007.

CAO, J.; LAI, Q.; YUAN, J.; SHAO, Z. Genomic and metabolic analysis of fluoranthene degradation pathway in *Celeribacter indicus* P73T. **Nature** 5: 1- 12, 2015.

CARVALHO, P.H.V.; JESUS, A.M.D.; PRATA, V.M.; BEZERRA, D.S.S.; ROMÃO, L.P.C.; NAVICKIENE, S. 2010. Tropical Peat as a Versatile Material for Solid-Phase Extraction of Pesticides from Medicinal Plant *Cordia salicifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 21: 659-664, 2010.

CARVALHO, T. V. **Biomateriais a base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traço e petróleo**. 98 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation** 3: 351-368, 1993.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 19: 324-333, 1997.

CERQUEIRA, S.C.A.; ROMÃO, L.P.C.; LUCAS, S.C.O.; FRAGA, L.E.; SIMÕES, M.L.; HAMMER, P.; LEAD, J.R.; MANGONI, A.P.; MANGRICH A.S. Spectroscopic characterization of the reduction and removal of chromium (VI) by tropical peat and humin. **Fuel** 91, 141–146, 2012.

CHEN, W-P; KUO, T-T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research** 21: 1993.

CHULALAKSANANUKUL, S.; GADD, G.M.; SANGVANICH, P.; SIHANONTH, P.; PIAPUKIEW, J.; VANGNAI, A.S. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. **FEMS Microbiology Letters** 262: 99–106, 2006.

CLAUDINO, A. **Preparação de Carvão Ativado a partir de turfa e sua utilização na remoção de poluentes**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CONTE, P.; ZENA, A.; PILIDIS, G.; PICCOLO, A. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. **Environmental Pollution** 112: 27-31, 2001.

COSTA, A. S.; ROMÃO, L. P. C, ARAÚJO, B. R.; LUCAS, S. C. O., MACIEL, S. T. A., WISNIEWSKI Jr., A.; ALEXANDRE, M. R. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. **Bioresource Technology** 105: 31–39, 2012.

COSTA, J.A.S. **Utilização de um novo material mesoporoso funcionalizado PABA-MCM-41 na remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)**. 2013. 88 páginas. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

COSTA, S. P.; ANGELIM, A. L.; SOUSA, M. F. V. Q.; MELO, V. M. M.; Vegetative cells of *Bacillus pumilus* entrapped in chitosan beads as a product for hydrocarbon biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation** 87:122-127, 2014.

COSTA, S. P. **Biodegradabilidade de n-hexano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. 119 páginas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

COUTO, S.; SANROMAN, M. A.; HOFER, D.; GUBITZ, G.M. Stain less steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. **Bioresource Technology** 95: 67–72, 2004.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas** 28: 143-160, 2007.

CPRM- Companhia de Pesquisa em Recursos Minerais, Serviço Geológico do Brasil. **Mapa Geológico do Estado de Sergipe**. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/arquivos/pdf/sergipe/sergipe_recmin.pdf> Acesso em: 24 de Janeiro de 2014.

CRINI, G. Recent developments in polyssacharide-based material used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science** 30: 38-70, 2005.

CRISTALE, J.; SILVA, F.S.; ZOCCOLO, G.J.; MARCHI, M.R.R. Influence of sugarcane burning on indoor/outdoor PAH air pollution in Brazil. **Environmental Pollution** 169: 210-216, 2012.

CUNHA, G. C.; ROMÃO, L.P.C.; SANTOS, M.C.; ARAÚJO, B.R.; NAVICKIENE, S.; PÁDUA, V.L. Adsorption of trihalomethanes by humin: Batch and fixed bed column studies. **Bioresource Technology** 101: 3345–3354, 2010.

DIAS, J.C.T.; REZENDE, R.P.; LINARDI, V.R. Biodegradation of acetonitrile by cells of *Candida guilliermondii* UFMG Y65 immobilized in alginate, k-carrageenan and citric pectin. **Brazilian Journal of Microbiology** 31: 61-66, 2000.

DODDAMANI, H. P.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of Phenanthrene by a *Bacillus* Species. **Current Microbiology** 41:11–14, 2000.

DÓREA, H. S.; BISPO, J. R. L.; ARAGÃO, K. A. S.; CUNHA, B. B.; NAVICKIENE, S.; ALVES, J. P. H.; ROMÃO, L. P. C.; GARCIA, C. A. B. Analysis of BTEX, PAHs and Metals in the Oilfield Produced Water in the State of Sergipe. **Brazilian Microchemistry Journal** 85: 234-238, 2007.

DRORI, Y.; AIZENSHTAT, Z.; CHEFETZ, B. Sorption of organic compounds to humin from soils irrigated with reclaimed wastewater. **Geoderma** 145, 98-106, 2008.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry** 114:1173–1182, 2009.

EATON, R W. Plasmid-Encoded Phthalate Catabolic Pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. **Journal of Bacteriology** 183, 3689- 3703, 2001.

EBELING, A.G.; ANJOS, L.H.C.; PEREZ, D.V.; PEREIRA, M.G.; GOMES, F.W.F. Chemical properties, organic carbon and humic substances of histosols in different regions of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 35: 325-336, 2011.

ELNASHAR, M.M.M.. The art of immobilization using biopolymers, biomaterials and nanobiotechnology. IN: Elnashar, M.M.M. (Ed.), **Biotechnology of biopolymers**, p. 3-32, 2011.

EL-TANAHY, A.M.M.; MAHMOUD, A. R.; ABDE-MOUTY, M. M.; ALI, A. H. Effect of Chitosan Doses and Nitrogen Sources on the Growth, Yield and Seed Quality of Cowpea. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 6: 115-121, 2012.

EMBRAPA, 1997. **Manual de métodos de análise de solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2ª edição: Atual, Rio de Janeiro, 212p.

ENGELHARDT, G.; WALLNOFER, P. R. Metabolism of di- and monon-butyl phthalate by soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 35:243-246, 1978.

FERNANDES, A. N.; ALMEIDA, C. A. P.; MENEZES, C. T. B.; DEBACHER, N. A.; SIERRA, M. M. D. Removal of methylene blue from aqueous solution by peat. **Journal of Hazardous Materials** 144: 412-419, 2007.

FRANCHI, J.G. **A Utilização de Turfa como Adsorvente de Metais Pesados: o Exemplo da Contaminação da Bacia do Rio Ribeira de Iguape por PB e Metais Associados**. 2004. Tese (Doutorado em Geoquímica e Geotectônica). Instituto de Geociências - Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

FRANCHI, J.G.; SÍGOLO, J.B.; LIMA, J.R.B. Turfa utilizada na recuperação ambiental de áreas mineradas: metodologia para avaliação laboratorial. **Revista Brasileira de Geociências** 33: 255-262, 2003.

GALVÃO, F.A.D.; VAHL, L.C.; Calibration of SMP method in organic soils from Rio Grande do Sul and Santa Catarina coast. **Revista Brasileira de Agropecuária** 2: 121-131, 1996.

GIRAUD, F.; GUIRAUD, P.; KADRI, M.; BLAKE, G.; STEIMAN, R. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. **Water Research** 35: 4126–4136, 2001.

GORE, A. J. P. Ecosystems of the world: swamp, bog, fen and moor. **Elsevier Scientific Publishing Company**, p. 159-164, 1983.

GRUBE, M.; GAVARE, M.; NESCIERCKA, A.; TIHOMIROVA, K.; MEZULE, L.; JUHNA, T. FT-IR spectroscopic analysis for studying Clostridium cell response to conversion of enzymatically hydrolyzed hay. **Journal of Molecular Structure**:1044, 201–205, 2013.

GUIBAL, E.; VICENT, T.; SPINNELI, S. Environmental of chitosan supported catalysts: Catalytic hollows fibers for the degradation of phenol derivatives. **Separation Science and Technology** 40: 633-657, 2005.

GUO, Y.; WU, K.; HUO, X.; XU, X. Sources, Distribution, and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Environmental Health** 73: 22-25, 2011.

GUPTA, R.; GIRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspectives. **Process Biochemistry** 38: 1599-1616, 2003.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials** 169:1-15, 2009.

HSIEH, F-M.; HUANG, C.; LIN, T-F.; CHEN, Y-M.; LIN, J-C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochemistry** 43: 83-92, 2008.

IARC, International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans**. Disponível em: < <http://monographs.iarc.fr/>> Acesso em 15/10/15.

INTERNATIONAL PEAT SOCIETY – IPS. **On peat and peatlands**. Disponível em: < <http://www.peatociety.fi>>, acessado em 03/03/2014.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. *Ciência e Natura* 29: 7 - 24, 2007.

JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F.A.O. Improved Enrichment and Isolation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-Degrading Microorganisms in Soil Using Anthracene as a Model PAH. **Current Microbiology** 58:628-634, 2009.

JESUS, A.M.D.; ROMÃO, L.P.C.; ARAÚJO, B.R.; COSTA, A.S.; MARQUES, J.J. Use of humin as an alternative material for adsorption/desorption of reactive dyes. **Desalination** 274: 13-21, 2011.

JIANLONG, W.; YI, Q. Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan- chitosan gels. **Chemosphere** 38: 3109-3117, 1999.

JIN, Q.; PAN, L.; LIU T.; HU, F. RNA-seq based on transcriptome reveals differential expression in *Chlamys farreri* exposed to carcinogen PAHs. **Environmental Toxicology and pharmacology** 39:313-320, 2015.

JOBIN, G.; COUTURE, G.; GOYER, C.; BRZENZINSKI, R.; BEAULIEU, C. **Applied Microbiology and Biotechnology** 68: 104-110, 2005.

JOHNSON, A.R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution** 113, 71-84, 2005.

JOSEPHY, P. D.; MANNERVIK, B.; MONTELLANO, P. O. **Molecular Toxicology**. Oxford University Press, New York, 368p, 1997.

KAFILZADEH, F.; AMIRI, P.; JAHROMI, A.R.; MOJOODI, N. Isolation and molecular identification of fluoranthene degrading bacteria from the mangrove sediments in South of Iran. **Internacional Journal of Bioscience** 3: 60-67, 2013.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology** 182, 2059-2067, 2000.

KANG, Z.; BUCHENAUER, H. Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. **Journal of Phytopathology** 148: 263–275, 2000.

KASSAI, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Polymer** 71: 497-508, 2008.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK S. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics** 28:1647–1649, 2012.

KELLEY, I.; FREEMAN, J.P.; EVANS, F.E.; CERNIGLIA, C.E. Identification of Metabolites from the Degradation of Fluoranthene by *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. **Applied of Environmental Microbiology** 59: 800-806, 1993.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M.S. Enzyme Immobilization. In: KENNEDY, J. F. (ed.) **Biotechnology**. New York: Cambridge, p. 348-404, 1987.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial Technology** 35: 126-139, 2004.

KUMAR, M.; PHILIP, L. Adsorption and desorption characteristics of hydrophobic pesticide endosulfan in four Indian soils. **Chemosphere** 62: 1064–1077, 2006.

KUMAR, S.; UPADHAYAY, S. K.; KUMARI, B.; TIWARI, S.; SINGH, S. N.; SINGH, P.K. In vitro degradation of fluoranthene by bacteria isolated from petroleum sludge. **Bioresource Technology** 102, 3709–3715, 2011.

KURITA, K.. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology** 8:203-226, 2006.

LATIMER, J. S.; ZHENG, J. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the arine Environment. PAHs: An Ecotoxicological Perspective In: Douben, P.E.T. (Org) **PAHs: An Ecotoxicological Perspective**. England: John Wiley & Sons, Pág 9-33 , 2003.

LEE, S-E.; SEO, J-S.; KEUM, Y-S.; LEE, K-J.; LI, Q.X. Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14. **Proteomics** 7: 2059–2069, 2007.

LEITÃO, A.L. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 6: 1393-1417. 2009.

LEITE, F.; MODESTO, C.M.D.; NASCIMENTO, R.F.; DIAS, F.S. Adsorção de Cd(II) de soluções aquosas em microesferas de n-carboximetil-quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros** 6: 213-236, 2005.

LEITE, N. F. **Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos (HPAs) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em Sedimentos: Desenvolvimento Analítico e Diagnóstico Ambiental**. 2008. 144 páginas Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LIMA, R. C. C. **Projeto Turfa na Faixa Costeira Bahia-Sergipe: relatório final**. Salvador: CPRM, p.129, 1992.

LIN, C., GAN, L., CHEN, Z. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). **Journal of Hazardous Material** 182: 771–777, 2010.

LIU, Z.; ZHOU, L.; WEI, P.; ZENG, K.; WEN, C.; LAN, H. Competitive adsorption of heavy metal ions on peat. **Journal of China University of Mining & Technology** 18: 255-260, 2008.

LOCATELLI, M.A.F. **Investigação sobre a emissão e caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos armáticos (HPA) na bacia do rio Atibaia**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2006.

LOH, K. C.; YU, Y. G. Kinetics of carbazole degradation by *Pseudomonas putida* in presence of sodium salicylate. **Water Research** 34: 4131-4138, 2000.

LU, J.; GUO, C.; ZHANG, M.; LU, G.; DANG, Z. Biodegradation of single pyrene and mixtures of pyrene by a fusant bacterial strain F14. **International Biodeterioration and Biodegradation** 87: 75 – 80, 2014.

LUCAS, S. C. O. **Avaliação da potencialidade da microbiota da turfa na biorremediação de agroquímicos neonicotinoides em água**. 2014. 112 páginas. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

LUZARDO, O. P.; RUIZ-SUÁREZ, N.; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A.; VALERÓN, P. F.; CAMACHO, M.; ZUMBADO, M.; BOADA, L.D. Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. **Science of the Total Environment** 472:146–153, 2014.

MACHÍN-RAMÍREZ, C.; MORALES, D.; MARTÍNEZ-MORALES, F.; OKOH, A.I.; TREJO-HERNANDEZ, M.R. Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. **International Biodeterioration & Biodegradation** 64: 538-544, 2010.

MADUEÑO, L.; COPPOTELLI, B.M.; ALVAREZ, H.M.; MORELLI, I.S. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation** 65: 345 -351, 2011.

MAGRINI, M. J. **Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas**. 2012. 91 Páginas. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2012.

MCCONNELL, E.L.; MURDAN, S.; BASIT, A.W. An investigation into the digestion of chitosan (non crosslinked and crosslinked) by human colonic bacteria. **Journal of Pharmaceutics Science** 97: 3820–3829, 2008.

MEIRE, R.O; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 11: 188-201, 2007.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, 37: 790-802, 2004.

MISHRA, S.; SINGH, S. N.; PANDE, V. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. **Bioresource Technology** 164: 299–308, 2014.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology** 161: 497-505, 2010.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U. JR. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. **Journal of Hazardous Material** 137: 762 – 811, 2006.

MOORE, P. D. The future of cool temperate bogs. **Environmental Conservation** 29: 3-20, 2002.

MORAES, M. A.; COCENZA, D. S.; VASCONCELLOS, F.C.; FRACETO, L.F.; BEPPU, M.M. Chitosan and alginate biopolymer membranes for remediation of contaminated water with herbicides. **Journal of Environmental Management** 127: 10-17, 2013.

MUELLER, J. G.; CHAPMAN, P. J.; BLATTMANN, B. O.; PRITCHARD, P. H. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. **Applied Environmental and Microbiology** 56: 1079-1086, 1990.

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in microbiology. In: Meyers, R.A. (Ed.), **Encyclopedia of Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000.

NEVES, F. L. **Caracterização de compostos voláteis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como indicadores da qualidade do ar no Rio de Janeiro**. 2002. 99 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências-Toxicologia Ambiental). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N.; SILVA, M.; SETTE, L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin** 62: 364–370. 2011.

PATEL, H.; GUPTE, A.; GUPTE, S. Biodegradation of Fluoranthene by Basidiomycetes Fungal Isolate *Pleurotus Ostreatus* HP-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 157: 367–376, 2009.

PATTERSON, R.A.; DAVEY, K. E FARNAN, N. Peat Bed Filters for on-site Treatment of Septic Tank Effluente. **Proceedings of on-site 01 Conference: Advancing Onsite Wastewater Systems**, R.A. Patterson & M.J. Jones (Eds.) Lanfax Labs Armidale Edition, 2001.

PAZOS, M.; ROSALES, E.; ALCANTARA, T.; GOMEZ, J.; SANROMAN, M. A.. Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: A review. **Journal of Hazardous Materials** 177: 1–11, 2010.

PENG, R. H.; XIONG, A. S.; XUE, Y.; FU, X. Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y. S.; YAO, Q. H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology** 32: 927–955, 2008.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology** 43:301-307, 2005.

RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.T. SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules – American Chemical Society** 4: 1457-1465, 2003.

RAYNAUD, X.; NUNAN, N. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. **Plos One** 9: 1-9, 2014.

REDDY, M.S.; NARESH, B.; LEELA, T.; M. PRASHANTHI, M.; MADHUSUDHAN, N.C.; DHANASRI, G.; DEVI, P. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. **Bioresource Technology** 101: 7980–7983, 2010.

REHMANN, K.; HERTKORN, N.; KETTRUP, A.A. Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. **Microbiology** 147: 2783–2794, 2001.

REN, H.; KAWAGOE, T.; JIA, H.; ENDO, H.; KITAZAWA, A.; GOTO, S.; HAYASHI, T. Continuous surface seawater surveillance on poly aromatic hydrocarbons

(PAHs) and mutagenicity of East and South China Seas. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 86: 395–400, 2010.

ROCHA, L.C.; SOUZA, A.L.; RODRIGUES FILHO, U.P.; CAMPANA FILHO, S.P.; SETTE, L.D.; PORTO, A.L.M. Immobilization of marine fungi on silica gel, silica xerogel and chitosan for biocatalytic reduction of ketones. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 84: 160– 165, 2012.

ROMÃO, L. P. C.; LEAD, J.R.; ROCHA, J. C.; OLIVEIRA, L. C.; ROSA, A. H., MENDONÇA, A. G. R.; RIBEIRO, A. S. Structure and Properties of Brazilian Peat: Analysis by Spectroscopy and Microscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 18: 714-720, 2007.

ROSA, A.H. **Substâncias húmicas: extração, caracterização, novas perspectivas e aplicações**. 2001. 108 páginas. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SALICIS, F.; KRIVOBOK, S.; JACK, M.; BENOIT-GUYOD, J. Biodegradation of Fluoranthene by Soil Fungi. **Chemosphere** 38: 3031-3039, 1999.

SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology** 20:243-248, 2002.

SANCHES, S. M.; DE CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares. **Eclética Química** 32: 49-56, 2007.

SANTOS, A.S.M.S.; AQUINO, A.; ROMÃO, L.P.C.; NAVICKIENE, S. A ovel Application of Natural Peat for Solid-Phase Extraction of Pyrimethanil, Flumetralin, and Kresoxim-Methyl in Water Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **ISRN Chromatography** 12: 1-5, 2012.

SANTOS, A; BOTERO, W. G.; BELLIN, I.A.; OLIVEIRA, L.C.; ROCHA, J.C.; MENDONÇA, A.G.R.; GODINHO, A.F. Interaction between Humic Substances and Metallic Ions: a Selectivity Study of Humic Substances and their Possible Therapeutic Application. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 18: 824-830, 2007.

SANTOS, R. A., MARTINS, A. A. M., NEVES, J. P., LEAL, R. A. Programa Levantamentos Geológicos Básicos do Brasil – PLGB. **Geologia e recursos minerais do Estado de Sergipe. Texto explicativo do Mapa geológico do Estado de Sergipe**. Brasília: CPRM/DIEDIG/DEPAT; CODISE, 2001. Disponível em <http://ftp.cprm.gov.br/pub/pdf/sergipe/> acesso em: 23 de setembro de 2013.

SARASWATHY, A.; HALLBERG, R. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. **FEMS Microbiology Letters** 210: 227- 232. 2002.

SEDARATI, M. R.; KESHAVARZ, T.; LEONTIEVSKY, A. A.; EVANS, C. S. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete

Trametes versicolor immobilized on nylon mesh. **Electronic Journal of Biotechnology** 6: 104-114, 2003.

SEO, J. S.; KEUM, Y.S.; LI, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 6: 278- 309, 2009.

SÉPIC, E.; BRICELJ, M.; LESKOVSEK, H. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. **Chemosphere** 52: 1125–1133, 2003.

SERESHK, Z. H.; BAKHTIARI, A. R. Distribution patterns of PAHs in different tissues of annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) and short sea snake (*Lapemis curtus*) from the Hara Protected Area on the North Coast of the Persian Gulf, Iran. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 109:116–123, 2014.

SHI, C.; ZHU, Y.; RAN, X.; WANG, M.; SU, Y.; CHENG, T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. **Journal of Surgical Research** 133: 185–192, 2006.

SILVA A.C., HORÁK I., CORTIZAS A.M., TORRADO P.V., RACEDO J.R., GRAZZIOTTI P.H., SILVA E.B., FERREIRA C.A. Peatbogs of the Serra do Espinhaço Meridional – Minas Gerais, Brazil. I - Characterization and classification. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 33: 1385-1398, 2009.

SILVA, M.; ESPOSITO, E.; MOODY, J. D.; CANHOS, V. P.; CERNIGLIA, C. E. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp. **Chemosphere** 57: 943–952, 2004.

SIMENC, J.; POTONIK, U. Rapid Differentiation of Bacterial Species by High Resolution Melting Curve Analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology** 47: 256–263, 2011.

SOLTANI, N.; KESHAVARZI, B.; MOORE, F.; TAVAKOL, T.; LAHIJANZADEH, A.Z.; JAAFARZADEH, N.; KERMANI, M. Ecological and human health hazards of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Isfahan metropolis, Iran. **Science of the Total Environment** 505: 712–723, 2015.

STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry – genesis, composition, reactions**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons. 496p, 1994.

SUN, Q.; YANG, L. The adsorption of basic dyes from aqueous solution on modified peat-resin particle. **Water Research** 37: 1535-1544, 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR A. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30: 2725-2727, 2013.

TANAKA, S.; OBA, K.; FUKUSHINA, M.; NAKAYASU, K.; HASEBE, K. Water solubility enhancement of pyrene in the presence of humic substances. **Analytical Chimica Acta** 337: 351-357, 1997.

THADATHIL, N.; VELAPPAN, S.P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. **Food Chemistry** 150: 392–399, 2014.

USEPA (US Environmental Protection Agency). **Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. EPA/600/R-93/089. 1993. Disponível em: <<http://epaprgs.ornl.gov/chemicals/help/documents/600R93089.pdf>>. Acesso em 10 de março de 2015.

VALLADARES, G. S.; PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C; BENITES, V. M.; EBELING, A. G.; MOUTA, R.O. Humic substance fractions and attributes of Histosols and related organic-matter soils from Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 38: 763-777, 2007.

VELA, N.; MARTÍNEZ-MENCHÓN, M.; NAVARRO, G.; PÉREZ-LUCAS, G.; NAVARRO, S. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from groundwater by heterogeneous photocatalysis under natural sunlight. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** 232: 32– 40, 2012.

VIGGIANI, A.; OLIVIERI, G.; SIANI, L.; DIDONATO, A.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P.; BARBIERI, P.; GALLI, E. An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. **Journal of Biotechnology** 123: 464-477, 2006.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: estrutura e função**. 4. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

VORLOP, K. D.; KLEIN, J. Entrapment of microbial cells in chitosan. **Methods Enzymology** 135: 259-268, 1987.

WANG, M.; WANG, C.; HU, X.; ZHANG, H.; HE, S.; LV, S. Distributions and sources of petroleum, aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from Bohai Bay and its adjacent river, China. **Marine Pollution Bulletin** 90: 88–94, 2015.

WANG, X.; DU, Y.; FAN, L.; LIU, H.; YING, H. Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, Characterization and Structure Activity study. **Polymer Bulletin** 55: 105-113, 2005.

WEI, Y.; HAN, I.; HU, M.; SHAO, M.; ZHANG, J.; TANG, X.. Personal exposure to particulate PAHs and anthraquinone and oxidative DNA damages in humans. **Chemosphere** 81: 280–1285, 2010.

WEIßENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology** 32, 479-484, 1990.

WU, Y-R.; LUO, Z-H.; VRIJMOED, L. L. P. Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. **Bioresource Technology** 101: 9666-9672, 2010.

XIANGCHUN, Q.; QIAN, T.; MENGCHANG, H.; ZHIFENG, Y.; CHUNYE, L.; WEI, G. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Daliao River watershed, China. **Journal of Environmental Sciences** 21: 865–871, 2009.

XU, C.; DONALD, J. Upgrading peat to gas and liquid fuels in supercritical water with catalysts. **Fuel** 102:16–25, 2012.

XU, H.X; WU, H.Y.; QIU, Y.P.; SHI, X.Q.; HE, G.H.; ZHANG, J.F.; WU, J.C. Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenolicum* from activated sludge. **Biodegradation** 22, 335–345, 2011.

YI, D.;YUAN, Y.; JIN, L.; ZHOU, G.; ZHU, H.; FINNELL, R.H.; REN, A. Levels of PAH–DNA adducts in cord blood and cord tissue and the risk of fetal neural tube defects in a Chinese population. **NeuroToxicology** 46, 73-78, 2015.

YU, M. H. **Environmental Toxicology**. Lewis Publishers, Boca Ratón, 255p, 2001.

APÊNDICE A

Artigo submetido à revista **Journal of Hazardous Materials** e, portanto, formatado segunda as especificações da mesma. O Comprovante de submissão encontra-se no Anexo B.

NEW BIOTECHNOLOGICAL APPROACH FOR PAH DEGRADATION USING BACTERIA FROM TROPICAL PEAT ENTRAPPED IN CHITOSAN BEADS

GARCIA, A.C.F.S.^a; ARAÚJO, B.R.^a; DINIZ, L.E.C.^b; ROMÃO, L.P.C.^{a,*}

^aLaboratory of Natural Organic Matter, Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil

^bLaboratory of Molecular Biotechnology, Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), 49025-040, São Cristóvão, SE, Brazil

***Corresponding author:**

Dr. Luciane Pimenta Cruz Romão

Federal University of Sergipe

Chemistry Department / Laboratory of Natural Organic Matter

Av. Marechal Rondon, Jardim Rosa Elze

São Cristóvão, 49100-000

Sergipe, Brazil

Tel.: +55 79 21056649; fax: +55 79 21056651

E-mail address: lucianeromao@uol.com.br

ABSTRACT

The *Serratia* sp. AC-11 strain isolated from tropical peat was selected for trapping in chitosan beads that were then used to biodegrade fluoranthene (at 100 mg L⁻¹). The beads produced were uniform in size, with an average diameter of 3 mm, and were characterized by SEM and FT-IR. The immobilized bacteria were able to degrade 76% of fluoranthene in 5 days and 84% in 10 days, at a degradation rate that was almost 50% higher than achieved using free-living cells. Furthermore, the beads with immobilized bacteria had the advantage of being reusable, with satisfactory biodegradation obtained during continuous cycles of use. The numbers of viable cells in the chitosan beads revealed the capacity of the strain to grow and multiply during the biodegradation process. This new bioproduct represents a low cost, efficient, eco-friendly, and practical solution for use in the bioremediation of areas contaminated by fluoranthene.

Keywords: Peat, immobilization, fluoranthene, *Serratia* sp., biodegradation.

1. INTRODUCTION

Peat is an organic soil that is continuously formed by a complex process of decomposition and humification of plant residues by microbial oxidation in flooded environments, on a millennial timescale [1]. Peat has traditionally been used as a fertilizer or as a substrate for cultivations in containers. More recently, it has been investigated for its potential as a natural absorbent during water treatment and for the decontamination of liquid wastes containing pesticides, heavy metals, and other toxic substances [2,3]. However, the use of peat should not be restricted only to the abiotic removal of contaminants, because the microorganisms (fungi and bacteria) associated with peat could have considerable potential for biotic transformations. This study is the first to explore its use in biotechnological applications.

Fluoranthene, an important component of petroleum sludge, is a non-alternant polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) that is mutagenic, carcinogenic, and teratogenic [4]. It is one of the PAHs listed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) as priority pollutants, necessitating its removal from the environment.

Compared to physical-chemical treatments, the use of microbial technology to remediate PAH-contaminated sites has been found to be an efficient, economical, eco-friendly, and adaptable option [5]. Among recent methods employed to improve bioremediation, the use of immobilized microorganisms has been increasingly exploited due to their advantages over systems that use free cells. These include the possibility of reuse, greater control over bioprocesses, easier recovery, higher catalytic stability, lower susceptibility to contamination by undesirable microorganisms, greater resistance to environmental burdens, and more efficient degradation of xenobiotic compounds, compared to free cells [6,7].

There are two types of cell immobilization: entrapment and attachment [8]. In the first, the organisms are entrapped in the interstices of fibrous or porous materials, or are physically restrained within or by a solid or porous matrix such as a stabilized gel or a membrane. In the latter, the microorganisms adhere to surfaces or other organisms by self-adhesion or chemical bonding. Among the methods mentioned, entrapment has been highlighted as providing greater protection against changes in environmental conditions, as well as improved viability of microorganisms [6,9].

Various natural and synthetic polymers are available for the immobilization of microorganisms [10, 11]. The preference for natural polysaccharides lies in the fact that they are abundant in nature, economically viable, and present low toxicity compared to those of synthetic origin [12]. Among the natural polymers, chitosan is known for its biodegradability, biological compatibility, and non-toxic properties [13].

Chitosan is a linear co-polymer of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine, obtained commercially from the deacetylation of chitin, the second most abundant polysaccharide in nature, which is found in the exoskeleton of crustaceans and insects [14]. Immobilization by entrapment in chitosan is performed by solubilizing the

polymer in a dilute organic acid, such as acetic acid or formic acid, to form a gel solution that can be added to the microbial biomass before the coagulation step in alkali or ionotropic solutions. This procedure enables the production of biomaterials in different geometrical configurations, including beads, films, and membranes [15].

Previous studies have reported the use of microorganisms entrapped in chitosan beads for the degradation of phenol [6], hexadecane [9], n-hexadecane [16], and oil [17]. However, there are no reports for PAH degradation.

The purpose of this study was to develop a product containing a bacteria strain isolated for the first time from tropical peat, which was entrapped in chitosan beads for use in fluoranthene degradation. In addition, the reuse of the beads was evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Bacteria isolation and molecular identification

The AC-11 strain used in this work was isolated from the peatland of Santo Amaro das Brotas, Sergipe State, Brazil (N 07° 20.729' W 88° 35.113'), as described by Madueño et al. [18], using fluoranthene as sole carbon source. The molecular identification of the isolated strain was performed using its 16S rRNA gene sequence. The bacterial genomic DNA extract was purified using an alkaline lysis protocol, and the 16S rRNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') as the forward primer and 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') as the reverse primer.

Amplification reactions were prepared using 2 μL of DNA (30 ng μL^{-1}) and 48 μL of the PCR mix containing: 5 μL of 10X buffer; 3 μL of MgCl_2 (50 mM); 2 μL of dNTPs (2.5 mM); 2 μL of each primer (10 mM); 0.4 μL of Taq DNA polymerase (5 U μL^{-1} , Invitrogen); 2.5 μL of dimethylsulfoxide (DMSO); and 31.1 μL of sterile

deionized water. The amplification was carried out as follows: one cycle at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 40 s, 56 °C for 40 s, 72 °C for 40 s, and a final extension step at 72 °C for 3 min. The PCR product was analyzed by electrophoresis, purified using a GE Healthcare kit, and then sequenced at the sequencing service of São Paulo University (USP). The forward nucleotide sequences were determined using a BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit and an automated ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The sequence was viewed, edited, and aligned using Geneious v. 6.1.8 software. Numts and stop codons were absent in the sequence. The determined sequence was then compared to those already deposited in GenBank, using BLAST/NCBI software.

2.2. Chitosan

The chitosan used in this work was 74% deacetylated and obtained from Polymar (Fortaleza, Brazil).

2.3. Effect of chitosan on the bacteria strain

The effect of chitosan on the bacteria strain was evaluated by growing cells in the presence of chitosan solution. A bacteria suspension with an optical density at 600 nm of 0.1 (10^8 CFU mL⁻¹) was used to inoculate 100 µL into tubes containing 1 mL of a solution of chitosan at a concentration of 4% in 1% acetic acid. After 1 and 24 h, aliquots of these cultures were transferred to nutrient agar medium and incubated at 32 °C for 24 h to determine the effect of the tested solution on bacterial growth.

2.4. Chitosanase production

The bacteria strain was grown in nutrient broth medium for 24 h at 32 °C, and 15 µL of the culture was then transferred to the surface of chitosanase detection agar. Chitosanase production was identified by the formation of a hydrolysis halo around the

colony after 48 h at 32 °C. All experiments were conducted in triplicate and positive controls were included.

2.5. Entrapment of bacteria in chitosan beads

The entrapment procedure was performed following the protocol described by Costa et al. [9], with some modifications. The bacteria strain was grown for 24 h in nutrient broth liquid medium at 32 °C and 150 rpm. After this, the isolate culture was adjusted to an optical density of 1.2 ± 0.02 at 600 nm. Subsequently, cells were harvested from a 30 mL culture sample by centrifugation for 10 min at 4 °C and 5000 rpm. The cells were resuspended in 0.5 mL of sterile 0.9% NaCl, and then added to 30 mL of 4% chitosan solution previously prepared in 1% acetic acid and sterilized for 10 min at 110 °C. The suspension was stirred for 10 min and left to stand for 10 min. Using a sterile burette, this mixture was dripped into a 1% sodium tripolyphosphate (TPP) solution (pH 9) for coagulation and the formation of beads. After stirring for 40 min, the beads were removed from the solution and washed three times for 10 min with 200 mL of sterile 0.9% NaCl solution.

To improve the consistency of the beads, they were treated with 0.2% of glutaraldehyde (previously sterilized at 110 °C for 10 min) for 1 h and then washed three times with 0.9% (w/v) NaCl solution. The beads were then ready for use in the biodegradation assays. To determine the number of viable cells inside the beads, 1 g of beads was macerated, serially diluted in 0.9% (w/v) NaCl, and plated out on nutrient agar for counting of colony-forming units (CFU/g). The entire procedure was carried out in a biological safety cabinet.

2.6. Characterization of the beads with immobilized bacteria

2.6.1. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra of the previously dried chitosan samples and the chitosan spheres with immobilized bacteria were obtained using KBr tablets (1:100, sample:KBr) and a Varian Model 640 IR spectrometer. The spectra were acquired by scanning from 4000 to 400 cm^{-1} , with resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans per sample, employing the spectrum for air as the background.

2.6.2. Scanning electron microscopy (SEM)

Photomicrographs of the chitosan spheres, with and without the immobilized bacteria, were obtained using a Hitachi Model TM 3000 scanning electron microscope operated under high vacuum with an acceleration voltage of 15 kV and a filament current of 1850 mA.

2.7. Fluoranthene biodegradation

Biodegradation assays were performed with free-living and immobilized bacteria cells. For the free-living cells, 200 μL of an adjusted culture with 10^8 CFU/mL was used. In the immobilized cells assay, 2 g of chitosan beads were used in 50 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of nutrient broth liquid medium. For both experiments, the fluoranthene concentration used was 100 mg L^{-1} and the incubation periods were 5 and 10 days. All experiments were performed in triplicate and the flasks were placed in an orbital rotary incubator set at 150 rpm and 32 $^{\circ}\text{C}$.

After the incubation period, the residual fluoranthene was extracted using ethyl acetate. The assay containing the immobilized chitosan beads was filtered in a Büchner apparatus to separate the beads and the liquid phase. The beads were washed with ethyl acetate (10 mL) and used to count the viable cells. The liquid phases obtained in the two experiments (using immobilized and free-living cells) were centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, followed by liquid-liquid extraction with 2 x 20 mL of

ethyl acetate in a separating funnel. Anhydrous Na_2SO_4 was added to the organic phase, which was then filtered and evaporated under vacuum. The residue was resuspended in ethyl acetate.

2.8. Reuse of chitosan beads with immobilized bacteria

The chitosan beads with immobilized bacteria were tested for their ability to be reused in continuous cycles of fluoranthene biodegradation. The same procedure described in Section 2.7 was followed. The beads retained in the Büchner apparatus filter after the incubation period of 5 days were immediately collected with a sterile spatula and transferred to a new liquid medium containing 100 mg L^{-1} fluoranthene. This reuse procedure was performed five consecutive times.

2.9. Determination of fluoranthene degradation using GC-FID

Quantitative analysis of fluoranthene degradation employed a Shimadzu GC 2010 gas chromatograph equipped with an AOC 20i auto-injector, a flame ionization detector (FID), and a DB5 column (J&W Scientific, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$). Hydrogen was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . The oven program was 100°C for 1 min, followed by ramping at 8°C min^{-1} up to 280°C , maintained for 7.5 min. Split mode was used, and the injector temperature was 250°C . Quantification was performed using anthracene as internal standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Molecular identification

The partial 16S rRNA gene sequence of the AC-11 strain was determined and deposited in Genbank under the accession number KP264565. A BLAST search revealed that the determined sequence had 100% identity with 16S sequences from different strains of *Serratia* sp., and was identified as *Serratia* sp. AC-11.

Serratia is a ubiquitous genus in nature and has been isolated from water, soil, animals (including man), and the surfaces of plants [19]. Previous studies have shown the ability of *Serratia* sp. to degrade compounds such as methyl parathion and p-nitrophenol [20], chitin [21], wastewater organic contaminants [22], and pulp and paper mill effluent [23]. In the case of PAHs, Machin-Ramirez et al. [24] described the capacity of *Serratia marcescens* to reduce almost 40% of benzo(a)pyrene.

3.2. Effect of chitosan on bacterial growth and chitosanase production

Evaluation of resistance to chitosan solution revealed that the *Serratia* sp. AC-11 strain tolerated up to 4% chitosan during 24 h, which made the beads more stable during agitation in the biodegradation assays.

The next step was to establish whether this strain produced chitosanase, given that this is an undesirable characteristic when it is intended to reuse the chitosan beads. Evaluation of enzymatic activity was performed by inoculating the bacteria onto chitosan agar in order to observe any halo formation after 48 h. The absence of a halo confirmed that no chitosanase was produced. The results of the tests therefore confirmed that the strain fulfilled all the requirements for immobilization in the chitosan beads.

3.3. Immobilization of cells in chitosan beads

The beads with immobilized bacteria were consistently uniform, with an average diameter of 3 mm and a content of 1×10^7 CFU/g of beads. However, disintegration of the beads occurred at the end of the fifth day of the biodegradation assays.

To try to discover the cause of this disintegration, pH measurements in the culture medium were made at the end of the experiment, since chitosan is readily soluble at acidic pH. No substantial change in pH was observed between the initial and final days, with values of 7.0 ± 0.02 and 6.81 ± 0.04 , respectively. A new investigation

of chitosanase production was therefore conducted. At the end of the fifth day of the experiment, an aliquot of the bacterial strain was inoculated on chitosan agar and incubated for 48 h at 32 °C. After this period, the formation of a hydrolysis halo around the inoculum was observed, confirming the production of this enzyme under these experimental conditions. It is possible that the prolonged assay with immobilized cells enabled expression of the gene responsible for production of the chitosanase enzyme.

According to Gupta et al. [25] the production of most hydrolytic enzymes, including chitosanase, is controlled by metabolic induction and repression. This indicated that inductive expression of the enzyme occurred under these experimental conditions. The digestibility of chitosan or any other immobilizing support is only required when the function of the support is to carry cells to the site of action [26]. Barreto et al. [16] also observed disintegration of chitosan beads during hexadecane biodegradation, due to chitosanase production by the trapped bacteria cells. To overcome this problem, it was necessary to treat the beads with 0.3% glutaraldehyde in order to increase the stability of chitosan.

The use of glutaraldehyde is attractive because of its commercial availability and low cost, as well as its high reactivity [27]. It reacts rapidly with amine groups at near-neutral pH and is more efficient than other aldehydes in generating thermally and chemically stable cross-links. The covalent linkage between the amine group of chitosan and the aldehyde group of glutaraldehyde is stable across wide ranges of pH and temperature, and is resistant to enzymatic hydrolysis. Glutaraldehyde does not prevent the biodegradation of chitosan, because it does not affect the enzymatic hydrolysis of β -1,4 linkages of the chitosan [28].

In this study, immediately after immobilization of the cells, the beads were treated with 0.2% glutaraldehyde for 1 h, which allowed the microorganism cells to

survive and was sufficient to generate a color change in the beads, from beige to orange, confirming reaction of the aldehyde groups of glutaraldehyde with the amines of chitosan [29].

After this cross-linking procedure, counting was performed of colony-forming units, with a value obtained of 3.4×10^6 CFU/g of beads. This result showed that cell losses occurred due to the cross-linking procedure, although these losses did not affect the use of the beads in the biodegradation tests.

No morphological differences were observed between the beads with and without cross-linking. However, at the end of the tenth day of the biodegradation test, the cross-linked beads remained intact and undamaged, in contrast to the beads without cross-linking (Fig. 1), confirming the resistance acquired following application of the cross-linking procedure. The integrity of the beads is essential for their reuse under controlled conditions in industrial processes, where characteristics such as stability and rigidity are essential [9].

3.4. Characterization of chitosan beads

3.4.1. Scanning electron microscopy (SEM)

The use of SEM enabled differentiation between the beads with and without immobilized bacteria (Fig. 2). In the presence of the bacteria, the bead surface was heterogeneous, wrinkled, and granular, facilitating colonization and increase in microbial biomass, resulting in biofilm formation [6].

3.4.2. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra for the *Serratia* sp. AC-11 strain, chitosan, and beads with immobilized bacteria are shown in Fig. 3.

The infrared spectrum of *Serratia* sp. AC-11 showed a broad absorption band centered at 3417 cm^{-1} and a shoulder at 3280 cm^{-1} , attributed to the overlapping of peaks associated with hydrogen bonds involving O-H groups of lipid and carbohydrate

structures and N-H of proteins. Bands at $2962\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$ were attributed to the stretching of C-H bonds in aliphatic structures, as confirmed by the asymmetric folding bands at 1459 cm^{-1} and 1387 cm^{-1} , both related to the presence of lipids. The presence of a shoulder at 1743 cm^{-1} was due to C=O stretching of aliphatic esters associated with the lipid structures present. Bands at 1655 cm^{-1} and 1548 cm^{-1} could be attributed to amide C=O stretching and N-H folding, respectively. These bands are present in almost all bacteria FTIR spectra [30]. An absorption band at 1238 cm^{-1} was ascribed to the symmetric stretching vibration of phosphate groups (P=O) characteristic of nucleic acids [31], and a broad band centered at 1075 cm^{-1} was associated with complex vibrational modes of the polysaccharide C-O bond [30].

In the chitosan infrared absorption spectrum, an intense broad band at 3435 cm^{-1} was related to the overlapping of peaks associated with O-H and N-H group hydrogen bonds. Bands at $2968\text{--}2857\text{ cm}^{-1}$ were assigned to aliphatic C-H stretching, and were confirmed by asymmetric and symmetric C-H bond folding bands at 1465 cm^{-1} and 1383 cm^{-1} , respectively. Bands at 1654 cm^{-1} and 1315 cm^{-1} were due to amide C=O and C-N stretching, respectively, while a band at 1565 cm^{-1} was assigned to folding of the amine N-H bond. An intense band at 1080 cm^{-1} and a shoulder at 1158 cm^{-1} were attributed to symmetric and asymmetric stretching of C-O-C of the glucopyranoside ring, respectively [32].

The infrared spectrum of the chitosan beads with immobilized bacteria did not show any changes in bond stretching that could be indicative of specific chemical interactions between the bacteria and chitosan. The spectrum showed similar features in terms of the characteristic overlapping bands, with increased intensity of the bands at 1651 cm^{-1} and 1565 cm^{-1} related to the contribution of amides, and broadening of the band at 3435 cm^{-1} attributed to O-H and N-H groups in both samples. It can therefore be

inferred that in the immobilization process, the chitosan effectively surrounded the bacterial biomass, which was therefore captured by means of a mechanical process. This mechanism was corroborated by the SEM images, in which the presence of a bacterial biofilm could be seen on the beads.

3.5. Fluoranthene biodegradation

Firstly, the chitosan beads were tested for the absorption of fluoranthene in the absence of immobilized bacteria (control). It was found that there was only 3.7% removal of fluoranthene from the medium. Biodegradation assays were then performed using the beads with immobilized bacteria, with analyses after 5 and 10 days showing that 76% and 84% of the fluoranthene had been degraded, respectively (Figure 4).

Comparison of fluoranthene biodegradation using *Serratia* sp. AC-11 free-living cells (10^8 CFU mL⁻¹) and immobilized bacteria, under the same experimental conditions, showed that the use of immobilized cells resulted in almost 50% increases in the biodegradation of this PAH, for both periods tested (Fig. 5).

The numbers of viable cells in the beads after the biodegradation periods were determined by counts of colony-forming units (CFU/g). The initial value for the beads was 3.4×10^6 CFU/g, as already described, while values of 2.3×10^7 CFU/g and 1.7×10^8 CFU/g were obtained after biodegradation periods of 5 and 10 days, respectively. This showed that the cells were able to continue multiplying during a sustained incubation period.

The degree of fluoranthene biodegradation was evaluated using a shorter incubation period, with the aim achieving faster results. In just one day, the immobilized bacteria were able to degrade 56% of the fluoranthene, followed by a progressive increase in degradation. Determination of the numbers of viable cells in the

chitosan beads revealed the capacity of the strain to grow and multiply during the biodegradation process, which was reflected in the biodegradation rate.

Immobilization of the bacteria on the chitosan beads provided protection against environmental stresses and an appropriate environment for cellular growth and metabolism. The formation of a biofilm and increased stability of the microbial system enables high degradation activity to be maintained for longer than found using free cells [6, 33].

The successful use of chitosan beads as a support for microorganism immobilization has been reported in other studies. Angelim et al. [17] developed a strategy for bioremediation of oil-contaminated areas employing a bacteria consortium immobilized on chitosan beads. Costa et al. [9] described the degradation of 90.8% of hexadecane using chitosan beads with *B. pumillus*. Barreto et al. [16] immobilized spores of *B. subtilis* and achieved n-hexadecane degradation of almost 100% in 48 h. Hsieh et al. [6] evaluated chitosan beads with immobilized *Pseudomonas putida* for phenol degradation and found that immobilization increased bacterial tolerance to high concentrations of this compound, resulting in improved rates of cell survival and growth, and greater phenol biodegradation. The present work is the first time that a *Serratia* sp. has been immobilized in chitosan beads.

3.6. Reuse of chitosan beads with immobilized bacteria

The advantages of the beads with immobilized bacteria produced in this study were further evaluated in continuous degradation cycles. Since the biodegradation achieved after 10 days (84%) was similar to that obtained after 5 days (76%), it was decided to use continuous cycles for periods of 5 days each. This choice considered factors including the energy consumption of the agitation equipment (shaker) and the time needed to obtain results, which would be important in possible applications on an

industrial scale. The results obtained for reuse of the beads with immobilized bacteria are shown in Fig. 6.

It was observed that fluoranthene continued to be biodegraded throughout the five continuous reuse cycles, with a difference of 17% between the biodegradation rates in the first cycle (76%) and the fifth and final cycle (59%). The first three cycles showed negligible differences (<3%) in the rates of biodegradation. At the end of the fifth reuse cycle, most of the beads remained morphologically intact, with 1.9×10^6 CFU/g of beads.

The ability to reuse the immobilized cells is one of the most important advantages of this technique, especially when the support chosen is inert and has high mechanical resistance [34]. The beads with immobilized bacteria produced in the present work proved to be suitable for use in continuous reuse cycles, with satisfactory degradation of fluoranthene and stability in terms of the number of viable cells. The ability to reuse immobilized cells reduces operational costs and improves efficiency, with greater stability and activity of the bacteria over longer periods, as also demonstrated by Hsieh et al. [6]. Additional to the use of immobilized cells at the scale of flask experiments, they have also been used in bioreactors. Sarma and Pakshirajan [35] investigated the use of *M. frederiksbergense* immobilized in calcium alginate and reported complete degradation of pyrene, with a very higher degradation rate of $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. These findings demonstrate the possible application of immobilized cells on an industrial scale.

The fluoranthene biodegradation efficiency achieved using the chitosan beads with immobilized *Serratia* sp. AC-11 produced in this study was surprising in at least three respects. The first was the isolation of this strain for biotechnological purposes from a peatland that had never been previously explored for this purpose; the second

was the PAH biodegradation rate achieved using the beads with immobilized bacteria; and the third was the ability to reuse the modified beads.

5. CONCLUSIONS

This is the first work to investigate the use of peat microorganisms for biotechnological purposes. The findings revealed that the peat environment could provide a useful source of PAH-degrading microorganisms.

The successful immobilization of the *Serratia* sp. AC-11 strain on chitosan beads offers an innovative approach to the biodegradation of fluoranthene and possibly other PAHs. The immobilized beads were able to efficiently biodegrade fluoranthene, with the additional advantage of being able to be reused. This novel bioproduct is low cost, efficient, eco-friendly, practical, and is potentially suitable for use on an industrial scale for the bioremediation of areas contaminated by PAHs.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process n° 307029/2013-1) and Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE, process n° 01920300723/201-1).

REFERENCES

- [1] Romão, L.P.C., Lead, J.R., Rocha, J.C., Oliveira, L.C., Rosa, A.H., Mendonça, A.G.R., Ribeiro, A.S. Structure and properties of Brazilian peat: Analysis by spectroscopy and microscopy. *J. Brazil. Chem. Soc.* 18 (2007) 714-720.
- [2] Batista, A.P.S., Romão, L.P.C., Arguelho, M.L.P.M., Garcia, C.A.B., Alves, J.P., Passos, E.A., Rosa, A.H. Biosorption of Cr (III) using in natura and chemically treated tropical peats. *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 517- 523.
- [3] Costa, A.S., Romão, L.P.C., Araújo, B.R., Lucas, S.C.O., Maciel, S.T.A., Wisniewski Jr., A., Alexandre, M.R. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresour. Technol.* 105 (2012) 31–39.
- [4] Mishra, S., Singh, S.N., Pande, V. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. *Bioresour. Technol.* 164 (2014) 299–308.
- [5] Kumar, S., Upadhyay, S.K., Kumari, B., Tiwari, S., Singh, S.N., Singh, P.K. In vitro degradation of fluoranthene by bacteria isolated from petroleum sludge. *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3709–3715.
- [6] Hsieh, F-M., Huang, C., Lin, T-F., Chen, Y-M., Lin, J-C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochem.* 43(2008) 83–92.
- [7] Elnashar, M.M.M. The art of immobilization using biopolymers, biomaterials and nanobiotechnology, in: Elnashar, M.M.M. (Ed.), *Biotechnology of Biopolymers*, 2011 pp. 3-32.
- [8] Couto, S., Sanroman, M.A., Hofer, D., Gubitz, G.M. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresour. Technol.* 95 (2004) 67–72.
- [9] Costa, S.P., Angelim, A.L., Sousa, M.F.V.Q., Melo, V.M.M. Vegetative cells of *Bacillus pumilus* entrapped in chitosan beads as a product for hydrocarbon biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 87 (2014) 122-127.
- [10] Rocha, L.C., Souza, A.L., Rodrigues Filho, U.P., Campana Filho, S.P., Sette, L.D., Porto, A.L.M. Immobilization of marine fungi on silica gel, silica xerogel and chitosan for biocatalytic reduction of ketones. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 84 (2012) 160-165.
- [11] Sedarati, M.R., Keshavarz, T., Leontievsky, A.A., Evans, C.S. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electron. J. Biotechnol.* 6 (2003) 104-114.
- [12] Crini, G. Recent developments in polysaccharide-based material used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 38-70.

- [13] Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014.
- [14] Ngo, M., Vo, T-S., Ngo, D-N., Kang, K-H., Je, J-Y., Pham, H.N-D., Byun, H-G., Kim, S-K. Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloid.* 51 (2011) 200-216.
- [15] Guibal, E., Vicent, T., Spinneli, S. Environmental application of chitosan-supported catalysts: Catalytic hollow fibers for the degradation of phenolic derivatives. *Separ. Sci. Technol.* 40 (2005) 633-657.
- [16] Barreto, R.V.G., Hissa, D.C., Paes, F.A., Grangeiro, T.B., Nascimento, R.F., Rebelo, L.M., Craveiro, A.A., Melo, V.M.M. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2121–2125.
- [17] Angelim, A.L., Costa, S.P., Farias, B.C.S., Aquino, L.F., Melo, V.M.M. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *J. Environ. Manage.* 127 (2013) 10-17.
- [18] Madueño, L., Coppotelli, B.M., Alvarez, H.M., Morelli, I.S. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 65 (2011) 345 -351.
- [19] Ashelford, K.E., Fry, J.C., Bailey, M.J., Day, M.J. Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont *et al.* 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 2281–2289.
- [20] Pakala, S.B., Gorla, P., Pinjari, A.B., Krovdi, R.K., Baru, R., Yanamandra, M., Merrick, M., Siddavattam, D. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1452–1462.
- [21] Kolstad, G.V., Horn, S.J., Van Aalten, D.M.F., Synstad, B., Eijsink, V.G.H. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28492–28497.
- [22] Gupta, A., Thakur, I.S. Biodegradation of wastewater organic contaminants using *Serratia* sp. ISTVKR1 isolated from sewage sludge. *Biochem. Eng. J.* 102 (2015) 115–124.
- [23] Haq, I., Kumara, S., Kumaria, V., Singh, S.K., Raj, A. Evaluation of bioremediation potentiality of ligninolytic *Serratia liquefaciens* for detoxification of pulp and paper mill effluent. *J. Hazard. Mater.* 305 (2016) 190–199.
- [24] Machín-Ramírez, C., Morales, D., Martínez-Morales, F., Okoh, A.I., Trejo-Hernandez, M.R. Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 64 (2010) 538-544.

- [25] Gupta, R., Giras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38 (2003) 1599-1616.
- [26] Jobin, G., Couture, G., Goyer, C., Brzezinski, R., Beaulieu, C. Streptomycete spores entrapped in chitosan beads as a novel biocontrol tool against common scab of potato. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (2005) 104-110.
- [27] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37 (2004) 790-802.
- [28] McConnell, E.L., Murdan, S., Basit, A.W. An investigation into the digestion of chitosan (non crosslinked and crosslinked) by human colonic bacteria. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3820-3829.
- [29] Leite, F., Modesto, C.M.D., Nascimento, R.F., Dias, F.S. Adsorção de Cd(II) de soluções aquosas em microesferas de n-carboximetil-quitosana. *Rev. Iberoam. Polim.* 6 (2005) 213-236.
- [30] Naumann, D. Infrared spectroscopy in microbiology, in: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 2000, pp.102-131.
- [31] Grube, M., Gavare, M., Nescerecka, A., Tihomirova, K., Mezule, L., Juhna, T. FT-IR spectroscopic analysis for studying *Clostridium* cell response to conversion of enzymatically hydrolyzed hay. *J. Mol. Struct.* 1044 (2013) 201-205.
- [32] Kassai, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Polymer* 71 (2008) 497-508.
- [33] Tao, X-Q., Lu, G-N., Liu, J-P., Li, T., Yang, L-N. Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6 (2009) 2470-2480.
- [34] Covizzi, L.G., Giese, E.C., Gomes, E., Dekker, R.F.H., Silva, R. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas* 28 (2007) 143-160.
- [35] Sarma, S.J., Pakshirajan, K.. Surfactant aided biodegradation of pyrene using immobilized cells of *Mycobacterium frederiksbergense*. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 65 (2011) 73-77.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Chitosan beads with immobilized bacteria at the end of the tenth day of the fluoranthene biodegradation assay. (A) Bead without cross-linking; (B) Bead with cross-linking using 0.2% glutaraldehyde.

Figure 2. Images of chitosan beads: (C1) bead without bacteria at x100 magnification; (C2) bead without bacteria at x1000 magnification; (D1) bead with immobilized bacteria at x100 magnification; (D2) bead with immobilized bacteria at x1000 magnification.

Figure 3. FT-IR spectra for the *Serratia* sp. AC-11 bacteria strain, chitosan, and beads with immobilized bacteria.

Figure 4. GC-FID chromatogram of fluoranthene biodegradation by (A) chitosan beads without immobilized bacteria (control); (B) beads with immobilized bacteria after 5 days; (C) beads with immobilized bacteria after 10 days.

Figure 5. Comparison of fluoranthene biodegradation after 5 and 10 days, using free and immobilized cells. The error bars represent the sample standard deviations.

Figure 6. Fluoranthene biodegradation by bacteria immobilized on beads, during continuous reuse cycles. The error bars represent the sample standard deviations.

TABLES

Table 1. Fluoranthene biodegradation (100 mg.L^{-1}) by immobilized bacteria on consecutive days, and counts of colony-forming units (CFU/g) on the beads.

Day	Biodegradation rate (%)	CFU/g
1	56.0	2.1×10^6
2	61.5	2.6×10^6
3	62.5	3.4×10^6
4	71.5	7.3×10^6
5	76.0	2.3×10^7
10	84.0	1.7×10^8

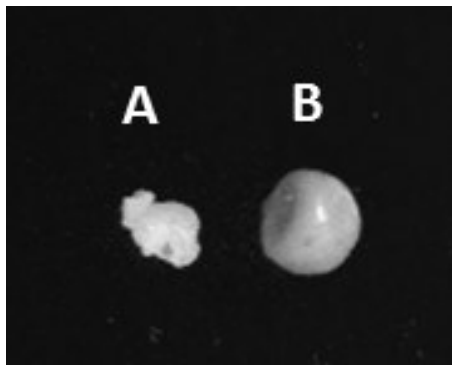
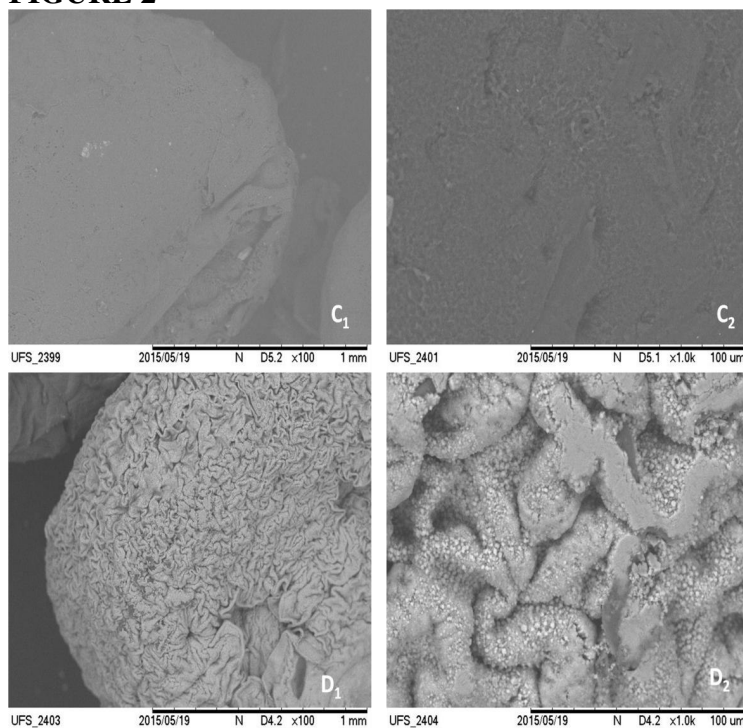
FIGURES**FIGURE 1****FIGURE 2**

FIGURE 3

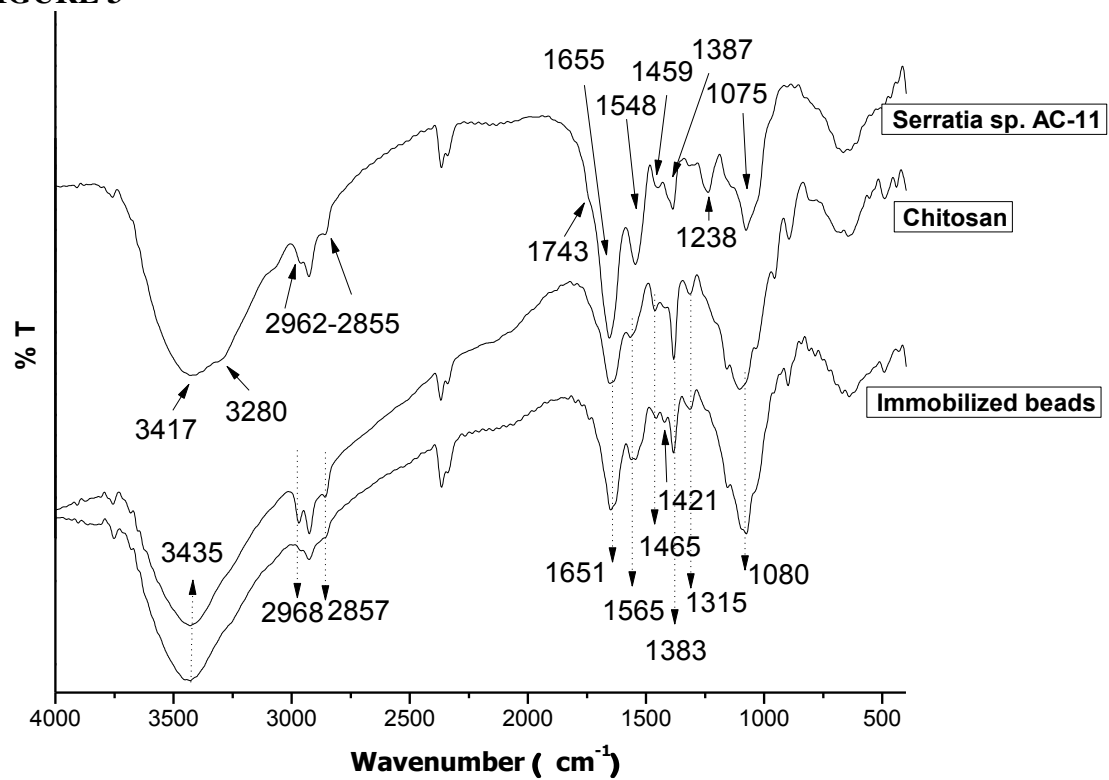


FIGURE 4

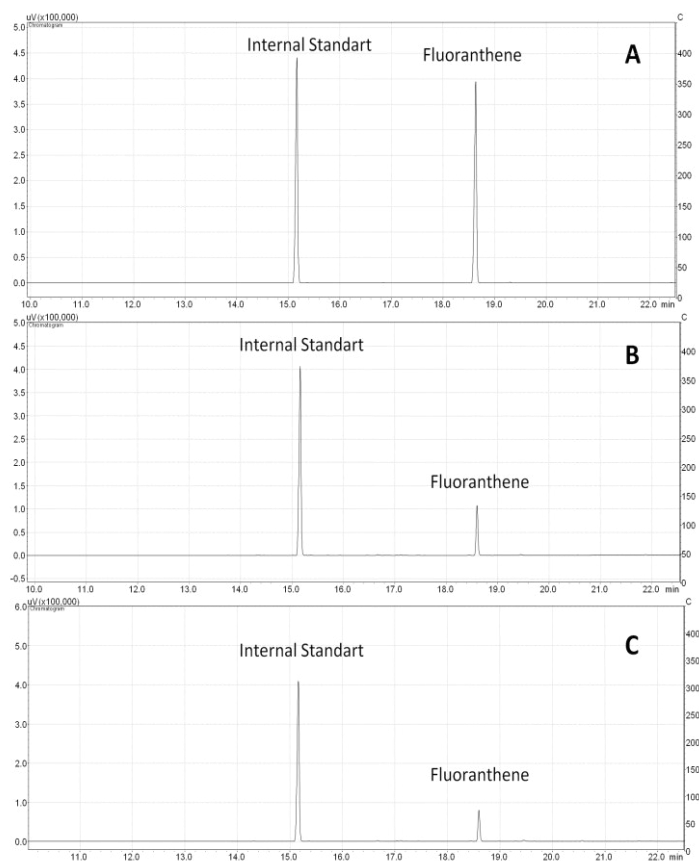
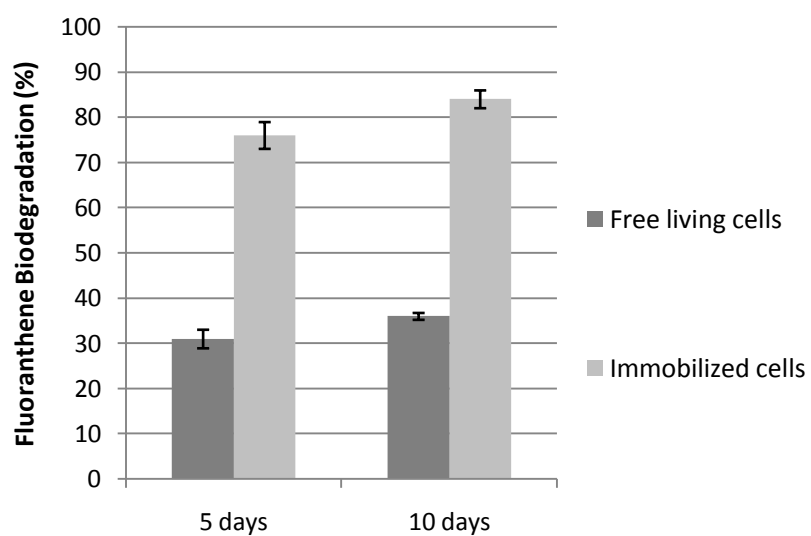
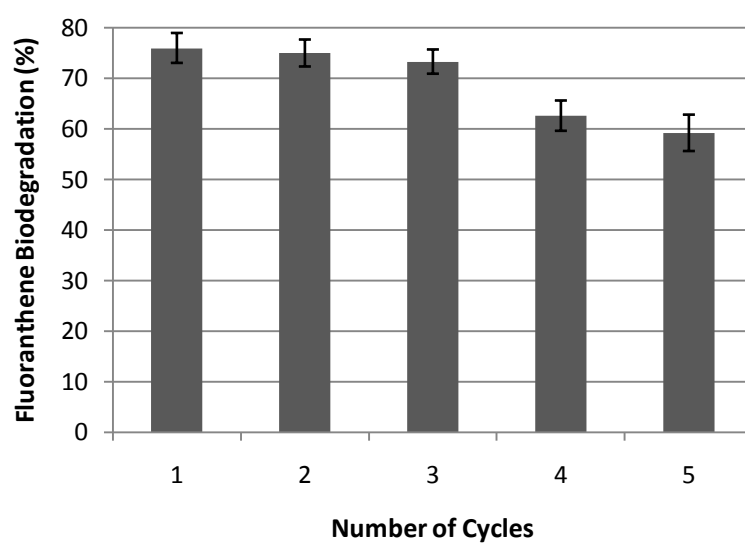


FIGURE 5**FIGURE 6**

APÊNDICE B

Artigo submetido à revista **Environmental Science: Process & Impacts** e, portanto, formatado segunda as especificações da mesma. O Comprovante de submissão encontra-se no Anexo C.

BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON BY FUNGI BIODIVERSITY FROM TROPICAL PEAT

GARCIA, A.C.F.S.^a; ARAÚJO, B.R.^a; BIROLI, W.G.^b; MARQUES, C.G.^c; BARBOSA JÚNIOR, A.M.^d; DINIZ, L.E.C.^e; PORTO, A.L.M.^b; ROMÃO, L.P.C.^{a,*}

^aLaboratory of Natural Organic Matter, Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil

^bLaboratory of Organic Chemistry and Biocatalysis, Institute of Chemistry of São Carlos, São Paulo University, 13563-120, São Carlos, SP, Brazil

^cLaboratory of Molecular Biodiversity and Conservation, Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

^dLaboratory of Applied Microbiology, Department of Morphology, Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil

^eLaboratory of Molecular Biotechnology, Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), 49025-040, São Cristóvão, SE, Brazil

***Corresponding author:**

Dr. Luciane Pimenta Cruz Romão
Federal University of Sergipe
Chemistry Department / Laboratory of Natural Organic Matter
Av. Marechal Rondon, Jardim Rosa Elze
São Cristóvão, 49100-000
Sergipe, Brazil
Tel.: +55 79 21056649; fax: +55 79 21056651.
E-mail address: lucianeromao@uol.com.br

ABSTRACT

The potential of fungi strains first time isolated from tropical peat was carried out for use them in fluoranthene biodegradation. Using this PAH as sole carbon source, it was possible to isolated three fungi identified as belonging to *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. All strains were tested for their ability to degrade 100 mg.L⁻¹ of fluoranthene during 14 and 28 days. It was found that the duration of the incubation period was proportional to the degree of biodegradation. The best biodegradation rate was achieved by *Penicillium* sp. AC-6 in 14 days (44%) and *Penicillium* sp. AC-1 in 28 days (64%). Analysis of metabolites enabled identification of three compounds common to all fungi analyzed: cyclopropa[1]phenanthrene, 2,3-dimethyl-9H-fluoren-9-one and bis (octyl) benzene-1,2-dicarboxylate. The formation of fluoranthene aliphatic metabolites, showed a particular feature of these fungi from tropical peat associated with this environment. The results obtained clearly demonstrate the efficiencies of tropical peat fungi in transform and detoxify fluoranthene to more water-soluble and less toxic metabolites, which could be used as carbon and energy sources by other microorganisms. The findings show to be promising for use these fungi in bioremediation processes of contaminated areas with fluoranthene.

Keywords: Fluoranthene; Peat, Fungi; Soil; Metabolites.

1. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of fused-ring aromatic compounds that possess carcinogenic, mutagenic, and toxic properties. They are ubiquitous environmental pollutants, and their low bioavailability and high hydrophobicity makes them difficult to treat and eliminate. The importance of minimizing the release of PAHs and the need to remove them from the environment resulted in the United States Environmental Protection Agency (USEPA) listing 16 PAHs as priority pollutants, including fluoranthene.¹

Fluoranthene, a four-ring compound, is one of the commonest PAHs in the environment.² According to Mishra et al.³ and Kumar et al.⁴, it is a major component of petroleum sludge. Studies by Dórea et al.⁵ who determined the levels of PAHs in the produced water of oilfields in the State of Sergipe, Brazil, showed that fluoranthene was one of the PAHs present at highest concentrations.

The hazards associated with PAHs can be overcome by the use of conventional methods which involve removal, alteration, or isolation of the pollutant. These technologies are expensive, and in many cases transfer the pollutant from one phase to another. On the other hand, bioremediation is the tool to transform the compounds to less hazardous forms with less input of chemicals, energy, and time.⁶

The use of microbial technology to clean up PAH-contaminated sites has been found to be a more efficient, economical, eco-friendly, and adaptable choice compared to physicochemical treatments.⁷ Given this ability of microorganisms, it is necessary to find promising candidates capable of degrading hydrocarbons and assisting in environmental decontamination.

In recent years, the fungal ability to degrade high-molecular-weight (HMW) xenobiotics had attracted attention due to the enzymatic predominance and multiplex

pathways.^{8,9} Fungi are more likely than bacterial intracellular enzymes to initiate attack on high molecular weight pollutants in the soil because of their ability to diffuse in the soil and release extracellular enzymes.¹⁰

Soil represents the largest global source of microbial diversity.¹¹ Peat is one of the most promising soils for microorganism prospecting, because of its continuous formation in a complex process of decomposition and humification of plant residues by microbial oxidation. According to Silva et al.¹² peatlands contributing to global carbon sequestration. Their environmental value and the importance of their preservation have led to the European Economic Community (EEC) considering peatlands as natural environments of priority interest for conservation.

Brazil possesses approximately 1.6×10^9 m³ of peat resources, distributed across more than 200 peatlands.¹³ In the state of Sergipe, there are 21 peatlands, totaling around 774 kt of peat (dry basis). Peat from Santo Amaro das Brotas in Sergipe has been studied in terms of its chemical composition¹⁴ and adsorption of organic¹⁵ and inorganic compounds¹⁶, but there have been no investigations of its microbiota. Peatlands are known to contain large microbial populations with wide metabolic diversity¹⁷, and for this reason it is important to evaluate the peat microbiota for potential use in biotechnological applications.

The aim of the present study was to isolate for the first time fungi from tropical peat suitable for the degradation of fluoranthene, analyzing the common metabolites produced *in vitro*, with a view to potential future bioremediation applications.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Peat collection

Approximately 1 kg of peat was collected in the peatland of Santo Amaro das Brotas, State of Sergipe, Brazil (N 07° 20.729' W 88° 35.113'). The soil was collected

from a depth of 5-20 cm and stored in a sterile glass bottle at 4 °C. The physicochemical properties: pH, organic matter, CTC, calcium, magnesium, aluminum, sodium, potassium, phosphorus, copper, manganese, and zinc were determined according to the procedures described by EMBRAPA.¹⁸

2.2. Fungi Isolation

The microorganisms were isolated as described by Madueño et al.¹⁹, with modifications. A 1.0 mL aliquot of soil suspension was inoculated into 9.0 mL of liquid mineral medium composed of (g L⁻¹): KCl, 0.7; KH₂PO₄, 2.0; Na₂HPO₄, 3.0; NH₄NO₃, 1.0). The mineral medium was supplemented with 1 mL L⁻¹ of a micronutrients solution (composition in g L⁻¹: MgSO₄, 4.0; FeSO₄, 0.2; MnCl₂, 0.2; CaCl₂, 0.2) and 100 mg L⁻¹ of fluoranthene as sole carbon and energy source. The cultures were incubated at 32 °C and 150 rpm for 7 days. After this, the surface spreading technique was performed using sabouraud agar. The purified isolates were kept refrigerated at 4 °C in test tubes containing slopes of sabouraud agar.

2.3. Molecular Identification of Fungi

2.3.1. Extraction of DNA from cultured fungi

The isolates were identified based on partial sequencing of the 18S rRNA gene. The genomic DNA was extracted from each culture using a NucleoSpin Plant II kit (Machereel-Negel), following the manufacturer's instructions.

The PCR was conducted using oligonucleotides corresponding to the ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') universal primers. The reactions were prepared using 2 µL of DNA (30 ng µL⁻¹) and 48 µL of the PCR mix, containing: 5 µL of 10X buffer; 3 µL of MgCl₂ (50 mM); 1 µL of dNTP's (2.5 mM); 1 µL of each primer (10 mM); 0.2 µL of Taq DNA polymerase (5 U µL⁻¹, Invitrogen), and 36.8 µL of sterile deionized water. The amplifications were

carried out as follows: one cycle at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 60 s, 60 °C for 60 s, 72 °C for 60 s, and a final extension step at 72 °C for 5 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis, purified using a GE Healthcare kit, and then sequenced at the sequencing service of São Paulo University (USP).

2.3.2. Nucleotide sequencing and phylogenetic analyses

The forward nucleotide sequences were determined using a BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit and an automated ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were viewed, edited, and aligned using Geneious v. 6.1.8 software. Numts and stop codons were absent in all the sequences. Homology searches were performed with BLAST/NCBI software and Neighbor-Joining trees were constructed in MEGA v. 6.0 using p-distance, complete deletion, and bootstrapping with 1000 replications. The sequences were deposited in GenBank.

2.4. Biodegradation assays

The fungal growth and biodegradation experiments were performed as described by Alvarenga et al.²⁰, with modifications. Potential fluoranthene-degrading fungi were prepared by growing them for 7 days at 32 °C in 2% malt extract agar, in the presence of 100 mg L⁻¹ fluoranthene. Seven mycelia discs (5 mm diameter) were inoculated into 50 mL of 2% malt extract medium, and cultivated for 5 days at 32 °C in an orbital shaker (130 rpm). After growth of the strains, the liquid medium containing fungal mycelia was supplemented with 100 mg L⁻¹ fluoranthene and the mixture was incubated in an orbital shaker (at 130 rpm and 32 °C) for 14 and 28 days. All the experiments were carried out in triplicate. The two types of control cultures were included, as described in Section 2.4.1.

After the incubation period, the culture was filtered in a Buchner apparatus and the mycelial mass obtained was rinsed, suspended in 30 mL of water:ethyl acetate (1:1),

and again filtered using a Buchner funnel. The mycelia dry weight was determined after drying at 32 °C for 7 days. The mycelia and the liquid medium were transferred to an Erlenmeyer flask, adjusted to pH 7, and extracted with ethyl acetate (2 x 30 mL). After separation, the organic phase was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and evaporated under vacuum. The residue was resuspended in 5 mL of ethyl acetate.

2.5. Determination of fluoranthene degradation using GC-FID and GC-MS

All the biodegradation experiment extracts were analyzed using a Shimadzu GC 2010 gas chromatograph equipped with an AOC 20i auto-injector, a flame ionization detector (FID), and a DB5 column (J&W Scientific, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The oven program was 100 °C for 1 min, followed by ramping at 8 °C min⁻¹ up to 280 °C, maintained for 7.5 min. Split mode was used, and the injector temperature was 250 °C. Quantification was performed using anthracene as internal standard.

The analysis of metabolites from PAH degradation was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using a Shimadzu GC-2010 Plus gas chromatograph coupled to a mass selective detector (Shimadzu MS-2010 Plus) operated in electron ionization mode at 70 eV. The GC-MS was equipped with a DB5 column (described above). The oven program was 90 °C for 2 min, followed by ramping at 6 °C min⁻¹ up to 280 °C, maintained for 6.33 min. Split mode was used, and the injector temperature was 250 °C. Metabolite identification was carried out using the NIST (05, 05s, 21, and 107) and Wiley 8 mass spectral libraries.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physicochemical characterization of the peat

The physicochemical characterization of the peat is summarized in Table 1. The chemical composition of organic soils is determined by the nature and rate of decomposition of the organic matter, the mineral fraction, and the chemical composition

of the water.²¹ Peat is classified as a histosol, due to its high content of organic matter ($>80 \text{ mg kg}^{-1}$) and low pH.

The pH value in water obtained in this study was in agreement with the data of Silva et al.¹², who showed that its acid character was due to the presence of humic and fulvic acids.

The concentration found in peat sample of Mg^{+2} was higher than Ca^{+2} and Na^{+} higher than K^{+} (Table 1). According to Ebeling et al.²¹ this effect may be related to tidal influence sediments and proximity to coastal areas.

According to Bragazza et al.²², peatlands are typically divided into ombrotrophic bogs, which are exclusively fed by atmospheric precipitation and for this reason have low nutrient availability, and minerotrophic fens, which receive water and nutrients from precipitation as well as from local groundwater, with higher nutrient availability resulting in greater biomass productivity. The peat from Santo Amaro das Brotas therefore resembled soil from minerotrophic fens, because it was influenced by groundwater and contained high levels of some micronutrients (Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+}) (Table 1). Nutrient-rich peat soils are known to contain large microbial populations with wide metabolic diversity, influenced by the environmental conditions.¹⁷

3.2. Isolation and identification of fungi

The search for new sources of microorganisms with biodegradation potential is growing worldwide for future applications in contaminated environments.²³

In this study, peat was shown to be a potential source of PAH-degrading microorganisms. Using fluoranthene as sole carbon and energy source, it was possible to isolate 3 fungal strains. This demonstrated that despite the fact that the peat used had

no history of PAH contamination, the isolated microorganisms were able to grow in a medium contaminated with fluoranthene and use the PAH for their survival.

The neighbor-joining tree for the fungi (Figure 1) also showed two strong clades, consisting of the *Penicillium* strains AC-1 (GenBank accession number KP264566) and AC-6 (KP264567), and the *Fusarium* strain AC-7 (KP264568).

Using BLASTn to search for sequence similarities, some of the strains showed high similarity with more than one specie, and it was not possible to identify strains at the species level. All the genera identified have been reported in the literature as potential candidates for the biodegradation of some PAHs, however for the first time are being described for fluoranthene biodegradation, specifically, and isolated from tropical peat never previously explored for this purpose.

Saraswathy and Hallberg ²⁴ showed that *Penicillium* species can metabolize pyrene as sole source of carbon and energy. Furthermore, Leitão ²⁵ demonstrated that *Penicillium* sp. strains could degrade various xenobiotic compounds, with low co-substrate requirements, which could be potentially useful for the development of economically feasible processes for the conversion of pollutants. Strains of *Fusarium solani* isolated from mangrove were tested by Wu et al. ⁹ in the biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene.

PAH-degrading microorganisms have been isolated from hydrocarbon-contaminated soils, which can be explained by to their tolerance towards the pollutants. The present findings demonstrate that other soils that are rich in nutrients, such as peat, can also provide a source of microorganisms that have biotechnological potential.

3.3. Fluoranthene biodegradation

The ability of pure fungi cultures to biodegrade fluoranthene in a liquid medium over different periods are summarized in Figure 2.

For all the strains analyzed, a longer period of incubation (28 days) resulted in greater fluoranthene degradation. It has been reported elsewhere that the rate of PAH degradation increases after longer growth periods^{3,8}. Kumar et al.⁴ found that the degradation of fluoranthene was initially slow due to its hydrophobicity, which restricted its availability to the microbes. However, following initial degradation, it is likely that polarity was introduced into the fluoranthene molecule by extracellular enzymes such as lignin peroxidase, laccase, and manganese peroxidase, which catalyze radical formation by oxidation and therefore destabilize molecular bonds.

The greatest biodegradation of fluoranthene was achieved by *Penicillium* sp. AC-1 was able to degrade 64% of the fluoranthene after 28 days of incubation, while the *Penicillium* sp. AC-6 and *Fusarium* sp. AC-7 strains degraded 60% and 51%, respectively. Substantial fluoranthene depletion (>26%) was achieved by the strains after 14 days of incubation, but the longer incubation period increased the degradation rate by 37% for *Penicillium* sp. AC-1, 24% for *Fusarium* sp. AC-7, and 16% for *Penicillium* sp. AC-6. In work by Passarini et al.⁸, *Aspergillus sclerotiorum*, *Mucor racemosus*, and *Cladosporium cladosporioides* were able to degrade 60.9%, 44.3%, and 30.9% of benzo(a)pyrene, respectively, after 8 days, while after 16 days the strains degraded 70.6%, 51.7%, and 45.3%, respectively.

In addition to determining the rates of fluoranthene biodegradation the growth of fungi was obtained by weighing the mycelial dry mass in the absence (control) and presence of fluoranthene in both incubation periods (Table 2).

The values obtained were lower in the presence of the xenobiotic, indicating an inhibition of growth or death of the fungal cells. This was also reported by Alvarenga et al.²⁰, who observed inhibition of the growth of *Penicillium decaturense* and *Aspergillus sydowii*, compared to the control, measured after 10, 20, and 30 days of

incubation during the biodegradation of methyl parathion. It was suggested that the microorganisms could have absorbed the xenobiotic, followed by its biotransformation in a defense mechanism, with subsequent cellular death and hence a reduction in the fungal dry mass.

Although there was an inhibition of growth, compared to the controls, there was an increase in dry mass after 28 days, compared to the amount after 14 days. This increase confirmed that even in the presence of fluoranthene in the liquid medium for a longer incubation period, the three strains of fungi were able to continue developing. This could have been one of the factors contributing to greater fluoranthene degradation.

In order to ensure that the disappearance of fluoranthene was not caused by poor extraction efficiency, a simplified validation of the fluoranthene extraction method was performed. At a concentration of 50 mg L^{-1} , an average value of $48 \pm 1.9 \text{ mg L}^{-1}$ was obtained for measurements in triplicate, representing an accuracy of 96% and a precision of 3.9%. Additionally, the liquid medium without microorganism inoculum was used as a blank control to detect abiotic degradation during the incubation period. Fluoranthene depletion of 1.9% was observed in the bacteria medium after 10 days of incubation, while depletion of 2.3% was found in the fungi medium after 28 days of incubation. These values indicate that abiotic loss of fluoranthene was negligible. Considering that fluoranthene has been classified as recalcitrant, due to its high molecular weight, the results achieved with the fungi isolated from peat could be considered satisfactory.

3.4. Common metabolites analyses

This study focused only in the common metabolites to determine a pattern of fluoranthene biodegradation from peat fungi and relate this to the peatland environment.

The metabolites formed during the biodegradation processes were analyzed using GC-MS. Cultivations of fungi in the absence of fluoranthene were performed in order to differentiate the natural metabolites from those induced by the presence of the PAH.

By overlaying and comparing the chromatograms obtained in the presence and absence of fluoranthene, it was possible to identify peaks corresponding to metabolites of the biodegradation. The same metabolites produced by the three fungi, respectively, were considered common metabolites. The peaks selected were those that showed good intensity and resolution. All the common metabolites were also analyzed to confirm their mass spectra.

Most knowledge on catabolic pathways of fluoranthene biodegradation and the corresponding metabolites is based on bacteria.^{26, 27} However there are few studies using fungi strains.^{28, 29} It is important to note that the aim of this paper is not to propose a pathway for fluoranthene biodegradation by fungi, but to indicate the common metabolites that could be used to provide further confirmation of the biodegradation of fluoranthene by selected fungi from peat.

The analyses of metabolites revealed the presence of compounds with functional groups that are related to biodegradation processes, such as fatty acids, alcohols, ketones and aldehydes (data not shown). Among of these compounds, three of them were common to all the fungi strains analyzed: cyclopropa[1]phenanthrene, 2,3-dimethyl-9H-fluoren-9-one, and bis(octyl) benzene-1,2-dicarboxylate (Table 3).

As is well known, there are two main types of fungal metabolism of PAHs mediated by the non ligninolytic and ligninolytic fungi. The first step in the metabolism of PAHs by non ligninolytic fungi is to oxidise the aromatic ring in a cytochrome P450 monooxygenase enzyme catalysed reaction to produce an arene oxide. On the other hand,

the ligninolytic fungi initial attack PAHs producing extracellular lignin peroxidases such as laccase, manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and dioxygenase, which catalyze radical formation by oxidation and therefore destabilize molecular bonds. This generates a selection of PAH-quinones and acids rather than dihydrodiols.^{6, 30}

The genus of fungi strains isolated in this work belonging to Ascomycota phylum, which is characterized by the production of ligninolytic enzymes.³¹ Degradation studies of the ligninolytic fungi have shown that PAHs may be degraded by a combination of ligninolytic enzymes, cytochrome P450 monooxygenases, and epoxide hydrolases that can result in the complete mineralisation of the compound. In this study it was possible to observe metabolites probably generated by the action of these several enzymes.

The cyclopropa[1]phenanthrene identified as a common metabolite has a similar structure to epoxide, with substitution of an oxygen atom by a carbon. Studies performed by Haristash and Kaushik⁶ indicated that epoxides generated by the cytochrome P450 monooxygenase system could also be involved in the degradation of PAHs. In the case of the *cyclopropa*[1]phenanthrene identified here, it is possible that a hydrolysis mechanism could result in formation of a dihydrodiol.³²

Formation of the metabolite 2,3-dimethyl-9H-fluoren-9-one proceeds via an intermediate metabolite, 9-fluorenone.^{33,34} The formation of 9-fluorenone indicates an initial attack on positions 1 and 2 of the fused aromatic ring portion of the fluoranthene molecule, probably mediated by a dioxygenase, with formation of a dihydroxylated fluoranthene intermediate and subsequent meta-cleavage of this intermediate.³⁵ However, in this study, the 9-fluorenone was methylated in the C2 and C3 positions, probably due to the specific metabolic profile of the microorganisms isolated from the

peat. Previous determination of the chemical profile of the peat indicated a high content of aliphatic compounds.^{14, 15} It is known that peat is formed by microbial decomposition of plants and animals in flooded environments, so it is possible that there is a relationship between the microorganisms present and the high content of aliphatic compounds in the peat, with characteristics of the metabolism of them acting to promote the formation of aliphatic compounds.

The last common metabolite found was bis(octyl) benzene-1,2-dicarboxylate. A study performed by Eaton³⁶ showed that phthalate esters are intermediate metabolites of certain fused-ring PAHs found in fossil fuels, including fluoranthene. Phthalate esters can be hydrolyzed by esterases to the corresponding monoesters and phthalic acids³⁷, and the latter have been identified as final metabolites of fluoranthene biodegradation.^{26, 27, 33} The phthalate ester identified here had a long aliphatic chain, further supporting the particular feature of these microorganisms of accumulating aliphatic metabolites.

A proportional relationship between the formation of bis(octyl)benzene-1,2-dicarboxylate and the degree of biodegradation was observed for fungal cultures (Figure 3) in the case of the longer incubation periods. The strains that provided the greatest fluoranthene biodegradation also produced the highest concentrations of bis(octyl)benzene-1,2-dicarboxylate.

As demonstrated by several authors, the phthalic acid is the final metabolite of the fluoranthene pathway. Unfortunately, this compound was not identified as a common metabolite under the experimental procedures of this study.

In general, the analyses of common metabolites structures resulted in the production of molecules with higher aqueous solubility and less biological reactivity than fluoranthene. This represents compounds more easily excreted which could be used as carbon and energy sources by other microorganisms.

4. CONCLUSIONS

This is the first work that isolated microorganisms from tropical peat to use in fluoranthene biodegradation. The findings demonstrated that peat environment can provide an important source of fungi capable of degrading fluoranthene and possible other xenobiotics.. The three fungi isolated provided satisfactory degradation of fluoranthene in different periods of incubation. Analysis of common metabolites generated revealed the formation of structures related to a metabolic fluoranthene pathway and demonstrated particular characteristics of the metabolism of these fungi associated to peatland environment. The biodegradation results obtained clearly demonstrate the efficiencies of these fungi, particularly in the initial steps of PAH degradation, because they are able to transform and detoxify fluoranthene to more water soluble and less toxic metabolites. Further work is required to obtain a better understanding of biodiversity in peat and to characterize the metabolism of the microorganisms.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC).

References

- 1 Bisht S., Pandey P., Kaur G., Aggarwal H., Sood A., Sharma S., Kumar V. Utilization of endophytic strain *Bacillus* sp. SBER3 for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system, *Eur. J. Soil Biol.*, 2014, 60,67-76.
- 2 Seo J.S., Keum Y.S., Li Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2009, 6, 278-309.

- 3 Mishra S., Singh S.N., Pande V. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition, *Bioresour. Technol.*, 2014, 164,299-308.
- 4 Kumar S., Upadhayay S.K., Kumari B., Tiwari S., Singh S.N., Singh P.K.. In vitro degradation of fluoranthene by bacteria isolated from petroleum sludge, *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 3709-3715.
- 5 Dórea H.S., Bispo J.R.L., Aragão K.A.S., Cunha B.B., Navickiene S., Alves J.P.H., Romão L.P.C., Garcia C.A.B. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. *Microchem. J.*, 2007, 85, 234-238.
- 6 Haritash A.K., Kaushik, C.P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review, *J. Hazard. Mater.*, 2009, 169,1-15.
- 7 Lu J., Guo C., Zhang M., Lu G., Dang Z. Biodegradation of single pyrene and mixtures of pyrene by a fusant bacterial strain F14, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2014, 87, 75-80.
- 8 Passarini M.R.Z., Rodrigues M.V.N., Silva M., Sette L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation, *Mar. Pollut. Bull.*, 2011, 62,364-370.
- 9 Wu Y-R., Luo Z-H., Vrijmoed L.L.P. Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments, *Bioresour. Technol.* 2010, 101, 9666-9672.
- 10 Wang, S., Nomura,N., Nakajima, T., Uchiyama, H. Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2015, 3, 345 - 50.
- 11 Mocali S., Benedetti A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology, *Res. Microbiol.*, 2010, 161, 497-505.
- 12 Silva A.C., Horák I., Cortizas A.M., Torrado P.V., Racedo J.R., Graziotti P.H., Silva E.B., Ferreira C.A. Peatbogs of the Serra do Espinhaço Meridional – Minas Gerais, Brazil. I - Characterization and classification, *R. Bras. Ci. Solo*, 2009, 33, 1385-1398.
- 13 Sanches S.M., Campos S.X., Vieira E.M. Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares, *Ecl. Quím.*, 2007, 32, 49-56.
- 14 Romão L.P.C., Lead J.R., Rocha J.C., Oliveira L.C., Rosa A.H., Mendonça A.G.R., Ribeiro A.S. Structure and properties of Brazilian peat: analysis by spectroscopy and microscopy, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2007, 18 714-720.
- 15 Costa A.S., Romão L.P.C, Araújo B.R., Lucas S.C.O., Maciel S.T.A., Wisniewski A. Jr., Alexandre M.R. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions

- (BTEx) from petroleum industry wastewater using biomass, *Bioresour. Technol.*, 2012, 105, 31-39.
- 16 Cunha G.C., Romão L.P.C., Santos M.C., Araújo B.R., Navickiene S., Pádua V.L. Adsorption of trihalomethanes by humin: Batch and fixed bed column studies, *Bioresour. Technol.*, 2010, 101, 3345-3354.
 - 17 Andersen R., Chapman S.J., Artz, R.R.E. Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review, *Soil Biol. Biochem.* 2013, 57, 979-994.
 - 18 EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo, second Ed., Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, 1997.
 - 19 Madueño L., Coppotelli B.M., Alvarez H.M., Morelli I.S. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2011, 65, 345-351.
 - 20 Alvarenga N., Birolli W.G., Selegim M.H.R., Porto A.L.M. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*, *Chemosphere*, 2014, 117, 47-52.
 - 21 Ebeling A.G., Anjos L.H.C., Perez D.V., Pereira M.G., Gomes F.W.F. Chemical properties, organic carbon and humic substances of histosols in different regions of Brazil, *R. Bras. Ci. Solo*, 2011, 35, 325-336.
 - 22 Bragazza L., Siffia C., Iacuminb P., Gerdol R. Mass loss and nutrient release during litter decay in peatland: The role of microbial adaptability to litter chemistry, *Soil Biol. Biochem.*, 2007, 39, 257-267.
 - 23 Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Camargo, F.A.O., Peralba M.C.R., Bento, F.M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 28, 1203-1222.
 - 24 Saraswathy A., Hallberg R. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 210, 227-232.
 - 25 Leitão A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2009, 6, 1393-1417.
 - 26 Cao J., Lai Q., Yuan J., Shao Z. Genomic and metabolic analysis of fluoranthene degradation pathway in *Celeribacter indicus* P73T, *Nature*, 2015, 5, 1-12.
 - 27 Rehmann K., Hertkorn N., Kettrup A.A. Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth, *Microbiology*, 2001, 147, 2783-2794.
 - 28 Hadibarata, T., Kristanti, R.A. Biotransformation Studies on Fluoranthene, a Four-ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, by White-Rot Fungus *Armillaria* sp. F 022

- Agric. Agric. Sci. Procedia, 2015, 3, 45 – 50.
- 29 Wirasnita, R., Hadibarata, T. Potential of the White-Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* F043 for Degradation and Transformation of Fluoranthene. *Pedosphere* 2016, 26, 49–54
- 30 Bamforth, S.M., SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biot.*, 2005, 80, 723–736
- 31 Blanchette, R.A. Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 1991, 29, 381-398.
- 32 Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation*, 1993, 3, 351-368.
- 33 Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Fu X.Y., Gao F., Zhao W., Tian Y.S., Yao Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 927-955.
- 34 Kanaly R.A., Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *J. Bacteriol.*, 2000, 182, 2059-2067.
- 35 Kelley I., Freeman J.P., Evans F.E., Cerniglia C.E. Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by mycobacterium sp. strain PYR-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 800-806.
- 36 Eaton R.W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacterkeyseri* 12B, *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 3689-3703.
- 37 Engelhardt G., Wallnofer P.R. Metabolism of di- and monon-butyl phthalate by soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, 35, 243-246.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. 18S rRNA neighbor-joining tree for the fungal strains and some GenBank sequences, using p-distance with 1000 replications.

Figure 2. Fluoranthene depletion by fungal strains after different incubation periods. The values are the means and standard deviations of three replicates.

Figure 3. GC-MS chromatogram of the bis(octyl) benzene-1,2-dicarboxylate metabolite for (a) *Penicillium* sp. AC-1, (b) *Penicillium* sp. AC-6, (c) *Fusarium* sp. AC-7, and (d) control without the presence of fluoranthene, after incubation for 28 days.

TABLES

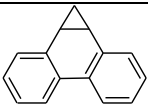
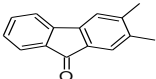
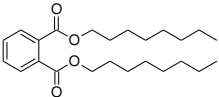
Table 1.**Table 1.** Physicochemical Characterization from Peat.

Parameters	Results
pH	4,1
Matéria Orgânica	80,7 g.dm ⁻³
CTC	9,68 cmol _c .dm ⁻³
Ca ⁺²	0,95 cmol _c .dm ⁻³
Mg ⁺²	1,61 cmol _c .dm ⁻³
Al ⁺³	1,88 cmol _c .dm ⁻³
Na ⁺	42,9 mg.dm ⁻³
K ⁺	25,2 mg.dm ⁻³
P	3 mg.dm ⁻³
Fe ⁺²	19,17 mg.dm ⁻³
Cu ⁺²	0,09 mg.dm ⁻³
Mn ⁺²	2,77 mg.dm ⁻³
Zn ⁺²	1,54 mg.dm ⁻³

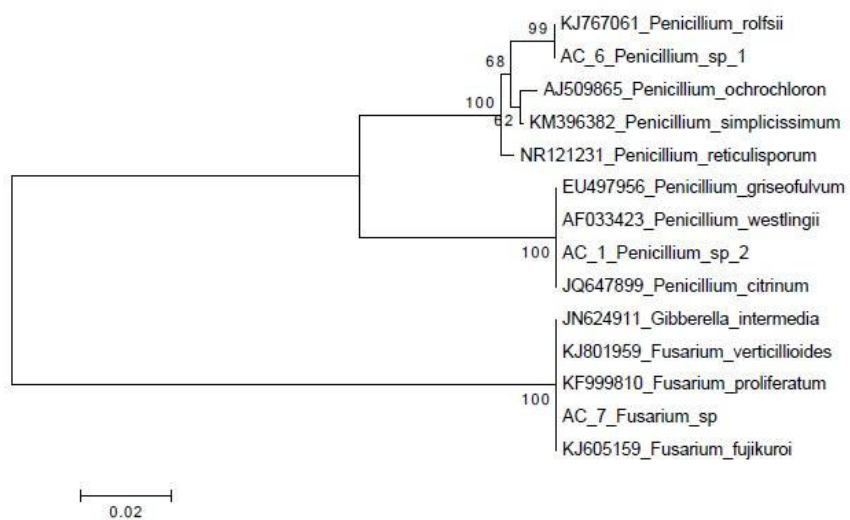
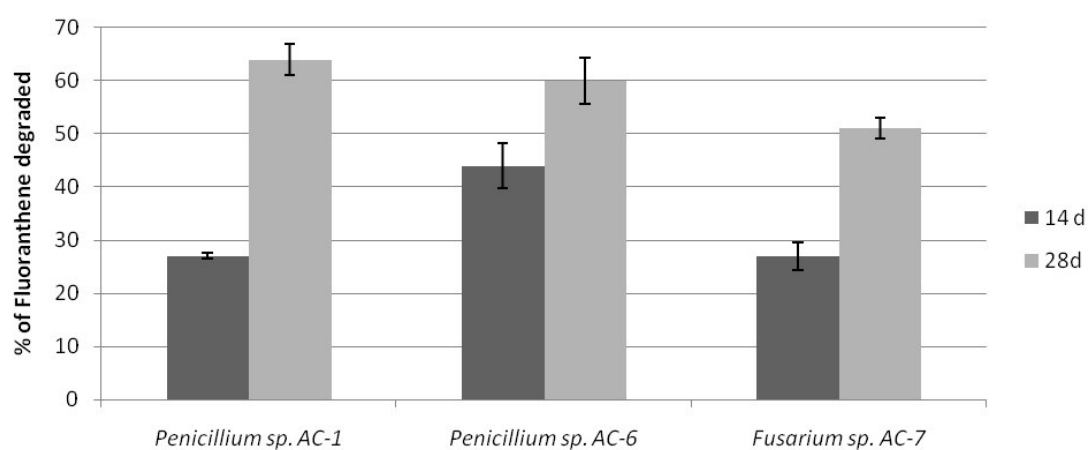
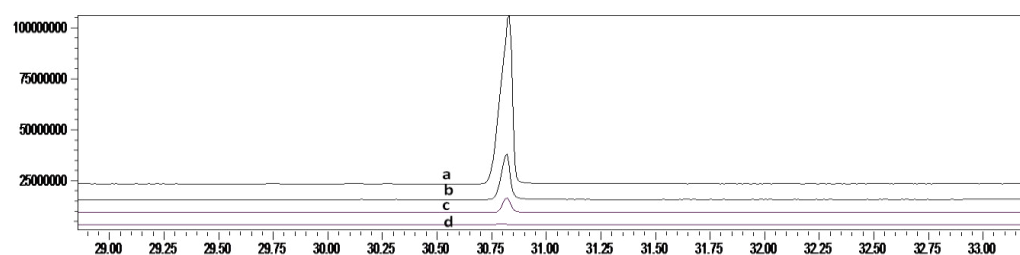
Table 2. Growth of fungi (g, dry mass basis).

Reaction Period	<i>Penicillium</i> sp. AC-1		<i>Penicillium</i> sp. AC-6		<i>Fusarium</i> sp. AC-7	
	Control	Biodegradation	Control	Biodegradation	Control	Biodegradation
14 days	0,65	0,62 ± 0,01	0,65	0,56 ± 0,04	0,61	0,52 ± 0,06
28 days	1,09	0,78 ± 0,12	0,88	0,68 ± 0,01	0,56	0,55 ± 0,05

Table 3. Common Metabolites identified from degradation of fluoranthene by fungi isolated from peat.

Metabolite	Estructure	Mol wt	Formula	R _t (min.)
Cyclopropa [1] phenanthrene		192	C ₁₅ H ₁₂	23.12
2,3-dimethyl-9H-fluoren-9-one		208	C ₁₅ H ₁₂ O	23.38
bis (octyl) benzene - 1,2 dicarboxylate		390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	30.75

Mol wt: Molecular weight. **R_t:** Retention time.

Figure 1**Figure 2****Figure 3**

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do e-mail recebido do **Genbank** como confirmação de submissão.

----- Forwarded message -----

From: <gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov>

Date: Fri, Dec 12, 2014 at 11:32 AM

Subject: GenBank KP264563-KP264568

To: guinartc@gmail.com, guinartc@hotmail.com

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your direct submission of sequence data to GenBank. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences:

BankIt1782220 AC_25	KP264563
BankIt1782220 AC_19	KP264564
BankIt1782220 AC_11	KP264565
BankIt1782520 AC_1	KP264566
BankIt1782520 AC_6	KP264567
BankIt1782520 AC_7	KP264568

The GenBank accession numbers should appear in any publication that reports or discusses these data, as it gives the community a unique label with which they may retrieve your data from our on-line servers. You may prepare and submit your manuscript before your accessions are released in GenBank.

Submissions are not automatically deposited into GenBank after being accessioned.

Each sequence record is individually examined and processed by the GenBank annotation staff to ensure that it is free of errors or problems.

You have requested that your data are to be held confidential until: Nov 28, 2016

They will not be released to the public database until this date, or until the data or accession numbers appear in print, whichever is first.

Since the flat file record is a display format only and is not an editable format of the data, do not make changes directly to a flatfile. For complete information about different methods to update a sequence record, see:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html>

Any inquiries about your submission should be sent to gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov

For more information about the submission process or the available submission tools, please contact GenBank User Support at info@ncbi.nlm.nih.gov.

Please reply using the original subject line. This will allow for faster processing of your correspondence.

Sincerely,

Beverly Underwood

Contractor

The GenBank Direct Submission Staff

Bethesda, Maryland USA

ANEXO B

Cópia do e-mail recebido da revista **Journal of Hazardous Materials** como confirmação de submissão.

Dear Dr. Anuska Garcia,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Hazardous Materials

Corresponding Author: Luciane Romão

Co-Authors: Anuska Garcia; Bruno Araujo; Leandro Diniz

Title: NEW BIOTECHNOLOGICAL APPROACH FOR PAH DEGRADATION USING BACTERIA FROM TROPICAL PEAT ENTRAPPED IN CHITOSAN BEADS

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at lucianeromao@uol.com.br; luciane@ufs.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/hazmat/l.asp?i=532999&l=GNFSSK4O>

More information on ORCID can be found on the ORCID website,

<http://www.ORCID.org>, or on our help page:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Journal of Hazardous Materials

ANEXO C

Cópia do e-mail recebido da revista **Environmental Science: Process & Impacts** como confirmação de submissão.

04-Mar-2016

Dear Professor Romao:

**TITLE: BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON
BY FUNGI BIODIVERSITY FROM TROPICAL PEAT**

Thank you for your submission to Environmental Science: Processes & Impacts, published by the Royal Society of Chemistry. This is an automatic acknowledgement that you have uploaded your files to our online submission system. Your manuscript ID

is: EM-ART- 03-2016-000134

Your manuscript will be passed to an editor for initial assessment as soon as possible. If there are any problems with your submission we will contact you.

Please indicate the above manuscript ID when you contact us about this submission. You can check the status of your manuscript by logging into your Author Centre (<https://mc.manuscriptcentral.com/em>).

The Royal Society of Chemistry is a member of CrossCheck. Your submission may be compared against the CrossCheck database using the iThenticate plagiarism detection software. For further information, please see here: <http://www.rsc.org/journals-books-databases/journal-authors-reviewers/processes-policies/#crosscheck>

Please contact us if we can be of any assistance.

Yours sincerely,
Environmental Science: Processes & Impacts Editorial Office
espi@rsc.org